

BEST AVAILABLE COPY

CERTIFICATE OF VERIFICATION

I, Ursula Scherz of Schlesierstr. 8, 81669 München, Germany,

state that the attached document is a true and complete translation to the best of my knowledge of German patent application 198 53 242.3.

Dated: September 15, 2004

Signature of Translator:



**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

URSULA SCHERZ

Translator for the English language duly registered, commissioned and sworn in by the München I Regional Court



Derivatization of Support Surfaces

The present invention relates to a method of derivatizing support or carrier surfaces and to support or carrier surfaces derivatized thereby.

The binding of biopolymers, in particular nucleic acids, to solid support or carrier surfaces is generally obtained to date by the following alternatives:

- 1) Applying biopolymers (e.g. nucleic acids) to surfaces: Here above all poly-L-lysine coated glass supports and nylon membranes are used. In this case, the biopolymers are bound to the support by means of charging. When poly-L-lysine coated glass supports are used, it is disadvantageous that no covalent linkage takes place between the coated surface and the biopolymer. The support can only be used once. Furthermore, there are virtually no possibilities of optimizing the distance between biopolymer and support. When nylon membranes are used, it is disadvantageous for the biopolymers to be also largely bound only by means of charging. Although the support may be used several times, it is not possible to optimize the distance between biopolymer and support.
- 2) *In situ* structure of biopolymers (e.g. nucleic acids) on surfaces: Here common linker systems are used which originate from the biopolymer synthesis on porous CPG materials. The linker molecules used are usually polyethylene glycol, in particular tetra- or hexaethylene glycol. The linker molecules are usually applied by cost-intensive reagents in analogy to the phosphoramidite chemistry. Mass production and the application of charges are unfortunately not possible.

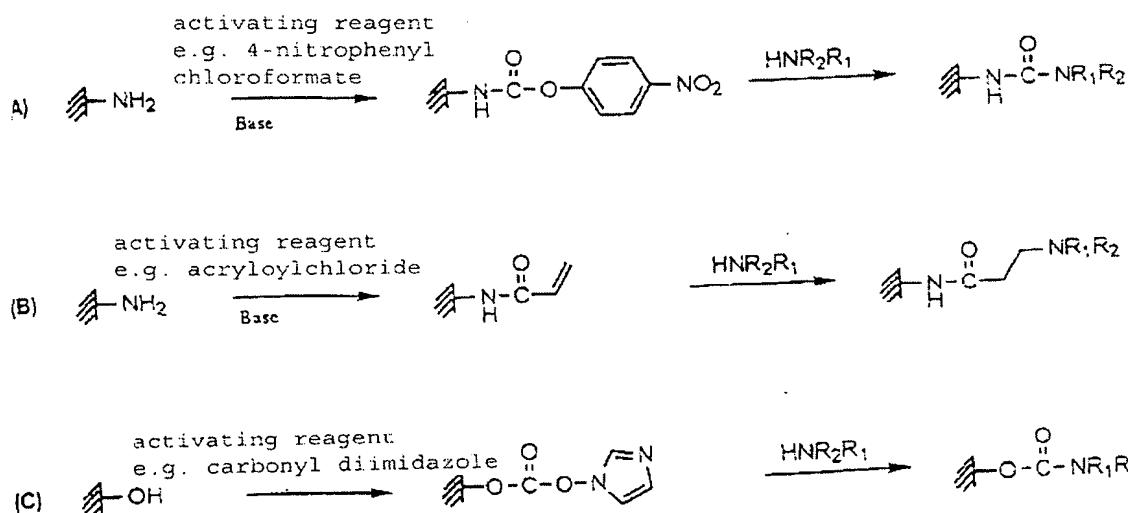
All of these methods also have the drawback of lacking flexibility, and the biopolymers can only be applied on the surface in very limited numbers.

The object of the present invention now consists in providing a method permitting optimum binding of a large number of biopolymers to support surfaces. The object also consists in providing a support surface whose binding capacity has been increased many times by carrying out a surface modification.

These objects are achieved by the subject matters defined in the claims.

In particular, this object is achieved by a method with which a functional group is activated on a support surface by an activating reagent and is subsequently reacted with an amine component.

The method according to the invention is preferably based on the following synthesis principles:



wherein R_1 and R_2 may be equal or different. The meanings of R_1 and R_2 are not subject to limitation and may be H or any organic residue (e.g. a straight-chain or branched alkyl residue having 1 to 30 carbon atoms, a straight-chain or branched alkenyl residue having 2 to 30 carbon atoms, a monocyclic or polycyclic alkyl residue having 3 to 30 carbon atoms or a monocyclic or polycyclic alkenyl residue having 4 to 30 carbon atoms or a monocyclic or polycyclic residue having 6 to 30 carbon atoms, wherein the residues may optionally be substituted by one or more substituents (e.g. OH, carboxyl, carbonyl, phosphate). The base may be any basic compound, e.g. diisopropylethylamine.

Any straight-chain or branched C_{1-30} alkyl residue may be used. Examples thereof are methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert.-butyl, n-butyl, n-hexyl, 2-methylpentyl, 2,3-dimethylbutyl, n-heptyl, 2-methylhexyl, 2,3-dimethylpentyl, 3,3-dimethylpentyl, 3-ethylpentyl, n-octyl, 2,2-dimethylhexyl, 3,3-dimethylhexyl, 3-methyl-3-ethylpentyl groups. Short alkyl chains, such as methyl, ethyl, propyl and isopropyl groups, are preferred.

Any straight-chain or branched C_{2-30} alkenyl residue may be used. Examples thereof are vinyl, propenyl, isopropenyl, allyl, 2-methylallyl, butenyl or isobutenyl, hexenyl or isohexenyl, heptenyl or isoheptenyl, octenyl or isoctenyl groups. Vinyl, propenyl and isopropenyl groups are preferred.

The cycloalkyl residue having 3 to 30 carbon atoms may be any cycloalkyl residue. Examples thereof are cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl or cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, cyclononyl or cyclodecyl groups. Cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl and cyclohexyl groups are preferred.

The cycloalkenyl residue having 4 to 30 carbon atoms may be any cycloalkenyl residue. Examples thereof are cyclobutenyl, cyclopentenyl or cyclohexenyl, cycloheptenyl, cyclooctenyl,

cyclononenyl or cyclodecencyl groups. Cyclobutenyl, cyclopentenyl, or cyclohexenyl groups are preferred.

Examples of polycyclic alkyl or alkenyl residues comprise norbornane, adamantane or benzvalene.

R₁ and R₂ may also be any monocyclic or polycyclic C6-30 aryl residues. Examples thereof are a carbocyclic, monocyclic residue, e.g. the phenyl group, a heterocyclic, monocyclic residue, e.g. the groups thienyl, furyl, pyranyl, pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, thiazolyl, oxazolyl, furazannyl, pyrrolinyl, imidazolinyl, pyrazolinyl, thiazolinyl, triazolyl, tetrazolyl, and the positional isomers of the hetero atom or atoms which may comprise these groups.

By the method according to the invention more or less cross-linked linker systems form on the support surface, which permit binding of an optionally large number of biopolymers on the support surfaces. Preferred biopolymers are DNA, RNA, nucleic acid analogs, peptides, proteins, antibodies, etc.

According to the invention a functional group is understood to mean a chemical grouping located on a support surface, such as an amino group, hydroxyl group, carboxyl group, carbonyl group, thiol, amide or phosphate group.

According to the invention any support or matrix common in this field can be used. They comprise in particular glass, sheets or films or membranes made of polypropylene, nylon, cellulose, cellulose derivatives (e.g. cellulose acetate, cellulose mixed ester), polyethersulfones, polyamides, polyvinyl chloride, polyvinylidene fluoride, polyester, teflon or polyethylene.

According to the invention an activating reagent is understood to mean a reagent which places functional groups located on the support surface in a condition ready for linkage. Preferred activating reagents are 4-nitrophenyl

chloroformate (= chloroformic acid-4-nitrophenylester), carbonyl diimidazole, acryloylchloride (acrylic acid chloride), phenylchloroformate, phosgene, diphosgene, triphosgene, EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride), N,N'-diisopropyl carbodiimide, dicyclohexyl carbodiimide, disuccinimidyl carbonate, disuccinimidyl oxalate, dimethylsuberimidate dihydrochloride or phenylene diisothiocyanate, the three former ones being most preferred.

According to the invention an amine component is understood to mean monoamines, bis-amines or polyamines. Preferred monoamines are 2-aminoethanol, 6-amino-1-hexanol, 2-(4-aminophenyl)ethanol, 5-amino-n-valeric acid, 2-(2-aminoethoxy)ethanol, 3-amino-1,2-propanediol; preferred bis-amines are 1,4-bis(3-aminopropoxy)butane, O,O'-bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol 500 (= Jeffamine 500), O,O'-bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol 130 (= Jeffamine 130), 4,7,10-trioxa-1,13-tridecaneamine, ethylene diamine, N-methylimidazole, diisopropylethylamine; and preferred polyamines are tetraethylene pentamine, spermine, spermidine, 4,7,10-trioxa-1,13-tridecane diamine, 4-aminomethyl-1,8-octane diamine. By incorporating amines preferably positive charges can be implemented into the linker system, since they are present in protonated condition within the physiological region. The degree of the surface charge can be controlled by selecting the corresponding amine. Positive charges effect an easier approach of negatively charged biopolymers (e.g. nucleic acids) and thus facilitate hybridizations on the support surfaces treated according to the invention. When bis-amines or polyamines are used, the chain length, i.e. the length of the linker system, can be controlled by the length of the amine and the number of repeated runs of the below synthesis principles. By selecting the amine it is possible to control the individual character of the linker system, i.e. whether it is rather hydrophobic or hydrophilic. By selecting the amine, other functional groups (e.g. hydroxyl, phosphate,

carboxyl, carbonyl groups) may, of course, also be presented on the surface in addition to amine groupings. For example, it is advantageous for introducing a linker carrying OH groups to carry out the reaction with an amine alcohol. When a bifunctional amine is used, the chain is extended linearly. Branchings are incorporated into the linker system by polyfunctional amine reagents. As a result, what is called dendrimer structures are built up (see figures 1 and 2). According to the invention a dendrimer structure means that structures result which start from a defined starting point and have more than one branches. The advantage of this is above all that in the case of support materials with otherwise low charging capacity (e.g. glass) the charging can be increased in well-calculated manner and thus greater amounts of biopolymers can be applied. When polyfunctional amines (m = number of the amino functions) are used, x positions (functions) may be utilized for a binding of biopolymers after n rounds (1 round = cycle from activation and reaction with amine) :

$x = (m-1)^n$ (in the case of activation with 4-nitrophenyl chloroformate or carbonyl diimidazole)

$x = m^n$ (in the case of activation with acryloylchloride)

Arithmetical example: tetraethylene pentamine ($m = 5$), 3 rounds ($n = 3$), acryloylchloride as activating agent ----> $5^3 = 125$, i.e. 125 times the charging capacity of the support

In order to obtain a more or less cross-linked linker system on the support surface, the above reactions are repeated in well-calculated fashion. By this, the distance between support material and the biopolymer to be bound is controlled and also the physical properties of the linker are defined. By the method according to the invention a flexible linker system is created. It is flexible in so far as for any use (e.g. binding of DNA, RNA, proteins,

antibodies) perfectly prepared support surfaces are provided. In particular, the method according to the invention is adapted to provide surfaces (supports) suitable for the DNA/biochip technology. The degree of positive charge on the surface can be controlled by a number of protonatable amine functions, above all by the incorporation of polyamines. For example, the objective of increasing the charging density is preferably realized by incorporating branching sites (e.g. polyamines); the increase in the positive surface charge may be effected by the incorporation of protonatable amino functions, for example; variation of the distance between biomolecule and surface can be controlled by using amines having different chain lengths.

The method according to the invention for modifying the surface is characterized by the following steps. The support materials to be derivatized are mixed in a reaction vessel with 5-100 ml (depending on the size), preferably 10-30 ml, most preferably 20 ml, anhydrous solvent (e.g. dichloroethane, tetrachlorocarbon, THF, DMF, DMSO, HMPT (= HMPA), dichloroethane, acetonitrile) with about 0.5 to 5 mmol, preferably 1-3 mmol, most preferably 1 mmol, activating reagent (e.g. acryloylchloride, 4-nitrophenylchloroformate, carbonyldiimidazole). The reaction is started in the case of acryloylchloride and 4-nitrophenyl chloroformate by adding about 0.5 to 5 mmol, preferably 1-3 mmol, most preferably 1 mmol, diisopropylethylamine (or another non-nucleophilic base, such as triethylamine, pyridine, collidine, lutidine or triisopropylamine). After 1 to 4 hours, preferably 2 hours, of swirling on a shaker, the supports are thoroughly washed with an anhydrous solvent (e.g. dichloroethane, tetrachlorocarbon, etc.) and allowed to dry, preferably air-blown using nitrogen. In order to check the reaction, a quality control is carried out. For example, the above-mentioned aminated PP control piece is subjected to the below described bromophenol blue test. If as compared to a non-reacted sample no blue staining can be detected, the activation was successful. If blue staining occurs, the reaction is repeated. The then activated support materials

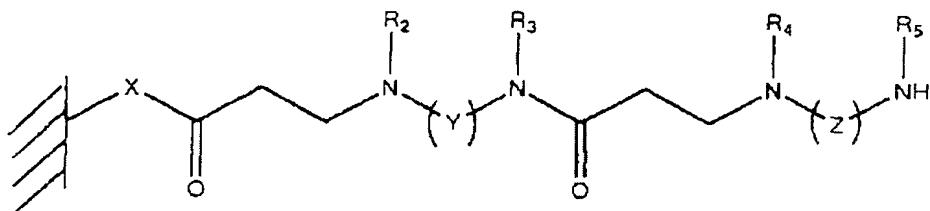
are admixed in about 5-100 ml (depending on the size), preferably 10-50 ml, most preferably 20 ml, of an amine-free and anhydrous solvent (e.g. DMF, acetonitrile, THF, DMSO, HMPT (HMPA) or dichloromethane) with about 0.5-5 mmol, preferably 1-3 mmol, preferably 1 mmol, amine component and swirled for about 5-20 hours, preferably overnight. Washing is carried out thoroughly, e.g. in succession with DMF, methanol and dichloroethane, and the then derivatized supports are allowed to dry or are air-blown using preferably nitrogen. In the case of supports activated using acryloylchloride, a reaction time extended to 1.5 to 2.5 days, preferably 2 days, is preferred. For checking the reaction, a quality control is carried out, e.g. the above-mentioned PP control piece is subjected to the below described bromophenol blue test. If as compared to an activated sample of the last step blue staining can be detected, the reaction was successful. If no or only very weak blue staining occurs, the reaction is repeated. The once derivatized supports can already be used as such or be subjected to the described cycle once more or several times.

For example, a method based on the blue staining of amino functions by bromophenol blue is suitable for controlling the quality of the support derivatization, i.e. detection takes place via the disappearance or appearance of the blue staining occurring with the activation or reaction with amines. For this purpose, each reaction vessel is provided in addition to the support materials to be derivatized with a piece of aminated polypropylene sheet (PP control piece) which serves for checking, on behalf of all of the support materials in the reaction vessel, the success of the respective reaction step. For this purpose, a piece of the control strip is removed after each reaction and swirled in a 1 % bromophenol blue solution in amine-free DMF for 2 minutes and then washed with ethanol. Amino functions and other basic groups yield an intense adsorptive blue staining. After carrying out the activation reactions (e.g. with acryloylchloride, 4-nitrophenylchloroformate, carbonyl-diimidazole), detection is made for the disappearance of the

blue staining. A quantification of the surface charge is possible by means of U.V. spectroscopy. Here, the adsorptive blue staining is removed from the support e.g. by means of a 10 % piperidine solution in DMF and is measured by means U.V. spectroscopy.

The linkers on the support surface have linear structures or dendrimer structures. The structures are built up as follows:

- preferred structure after activation using acryloylchloride



X = O, NHR₁

Y, Z = may be equal or different and may be selected from

- (CH₂)_n-

- (CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂

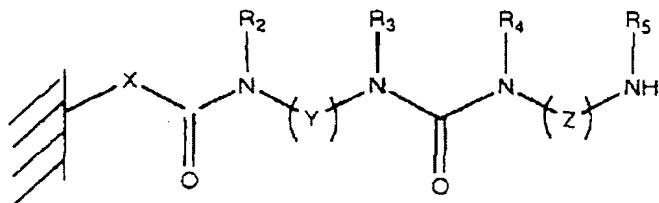
- (CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂- , etc.

R₁-R₅ = may be equal or different analogous to R₁ and R₂ above

n = 1-50, preferably 1-20, most preferably 1-10

or

- preferred structure after activation with chloroformic acid nitrophenylester or carbonyldiimidazole



X = O, NHR₁

Y, Z = may be equal or different and may be selected from
 - (CH₂)_n-
 - (CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂
 - (CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂-, etc.

R₁-R₅ = may be equal or different analogous to R₁ and R₂ above

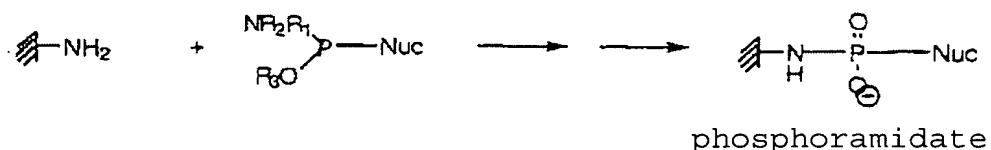
n = 1-50, preferably 1-20, most preferably 1-10

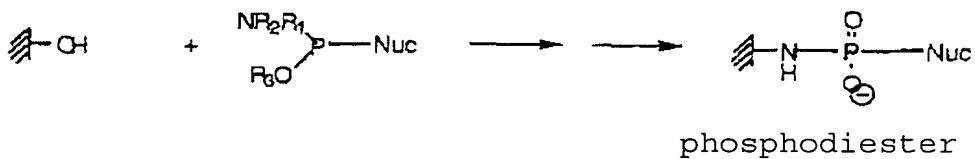
When biopolymers are fixed to support surface derivatized with the linker system, a distinction can, in principle, be made between the 2 cases (a) and (b):

(a) *In situ* synthesis of biopolymers (using the oligonucleotide synthesis as an example):

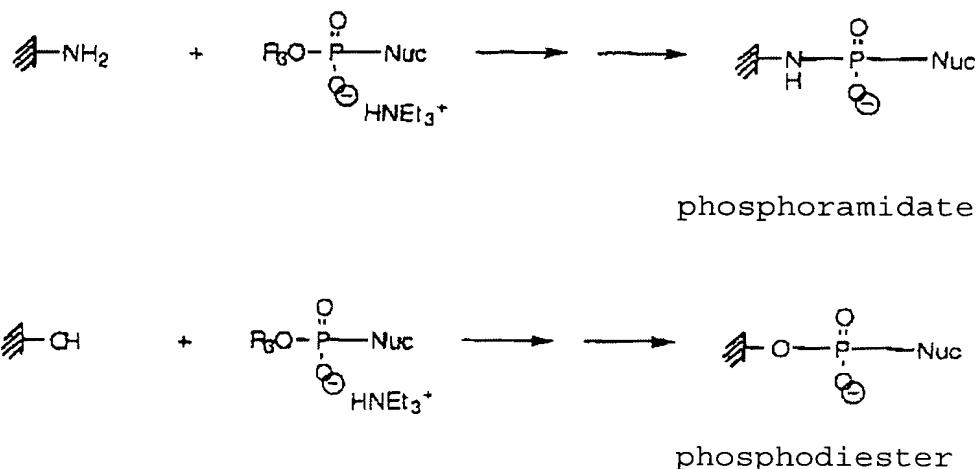
The derivatized support surfaces having terminal amino or hydroxyl functions do not require any further modification for binding the 1st oligonucleotide building block according to the phosphoramidite method or also the phosphotriester method. Having reacted the 1st nucleotide reagent with the aminated surface, phosphoramidate type bonds are produced. Hydroxylated surfaces result in phosphodiester type bonds.

Phosphoramidite method:





Phosphotriester method:



(Nuc = nucleoside)

$R_1 - R_3$ = analogous to R_1 and R_2 above

If phosphodiester type bonds are aimed at, it suffices not to react bis-amine in the last step but to react an amino alcohol within the linker-system synthesis.

(b) Binding of "prefabricated" biopolymers:

The binding of the biopolymer provides for the generation of a covalent (permanent) chemical linkage of the biomolecule to the support surface. To this end, a chemical bond must be produced between the biomolecule and the surface. In order to produce this bond, e.g. the following procedure is in consideration:

- (A) addition of a promoter
- (B) activation of one of the two reactants (biomolecule or surface). However, an activation of the

support surface has to be preferred over an activation of the biomolecule, since undesired cross-reaction among the activated biomolecules cannot be excluded - due to the usually polyfunctional character of the biomolecule - when the biomolecule *per se* is activated. This activation of the surface is preferably carried out using cross-linkers.

(A) Binding of the biopolymer using a promoter

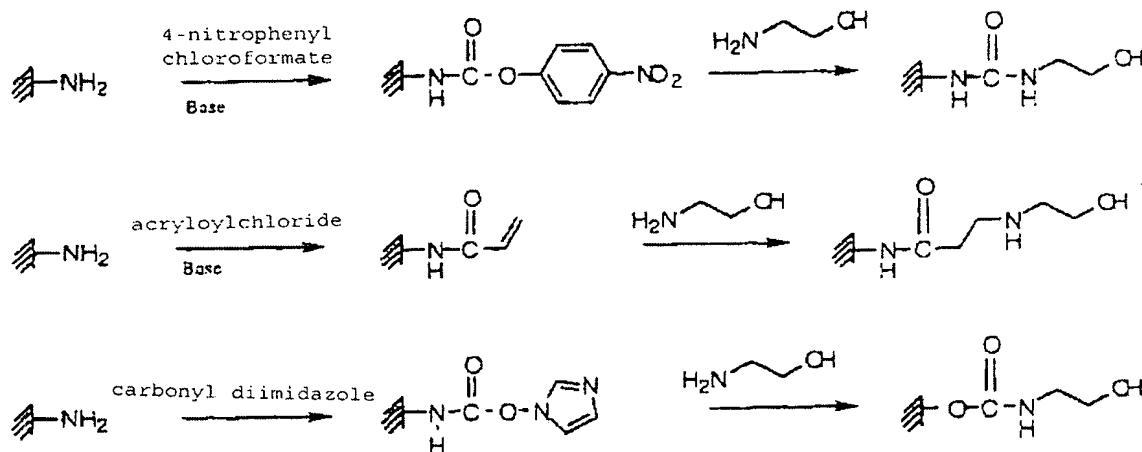
The possibility of using a promoter (catalyst) for producing the covalent bond between surface and biomolecule, is substantially a 3-component reaction. If as in the present invention possibilities are aimed at which shall permit to fix in highly parallel manner a large number of biopolymers to accurately predetermined positions on a support, this can be done due to cross-contamination only with more difficulty on plane surfaces using a 3-component system (sheets, glass or the like). Therefore, the promoter method is a special case for the covalent linkage of biopolymers on membrane type surfaces. Only here can the promoter be provided locally to the biomolecule to be bound in the pores of the membrane without cross-contamination having to be expected (cf. Example 4). For example, reagents of the carbodiimide type, such as diisopropylcarbodiimide, EDC or DCC (dicyclohexylcarbodiimide), are suitable as promoters. Furthermore, the terminal groups on the support and the biomolecule should preferably be orthogonal relative to one another, *i.e.* they should be able to meaningfully enter into a chemical bond. Here, preferably the following combinations of the terminal groups to be reacted result:

<u>Support surface</u>	<u>biomolecule</u>	<u>resulting binding type</u>
Amino (-NHR)	carboxy (-COOH)	amide bond
Amino (-NHR)	phosphate (-PO ₄ ²⁻)	phosphoramidite
Hydroxyl (-OH)	carboxy (-COOH)	ester
Hydroxyl (-OH)	phosphate (-PO ₄ ²⁻)	phosphodiester
Carboxy (-COOH)	amino (-NHR)	amide bond

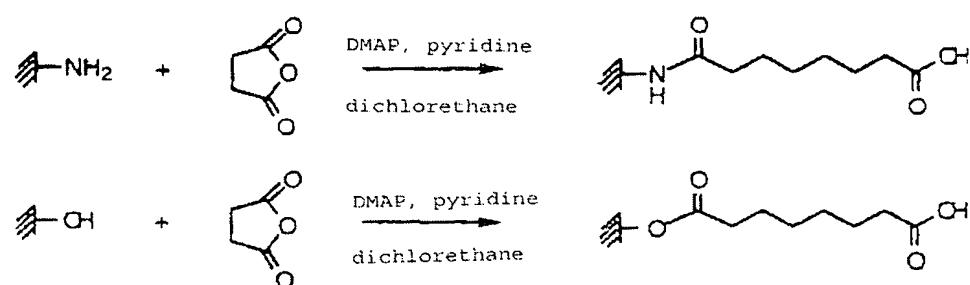
Carboxy (-COOH)	hydroxyl (-OH)	ester
Phosphate (-PO ₄ ²⁻)	amino (-NHR)	phosphoramidate
Phosphate (-PO ₄ ²⁻)	hydroxyl (-OH)	phosphodiester

Since the reactive groups (amine, hydroxyl, phosphate or carboxyl) are more or less given by the biomolecule, it is recommended that every biomolecule type has available a corresponding orthogonal surface type. In order to make available the support surface derivatization with the linker system for all of the above-mentioned combinations of terminal groups, methods were developed for re-derivatizing the surface of terminal amino functions (or also hydroxyl) on terminal hydroxyl, carboxyl and phosphate groups (cf. Examples 5, 6, 7).

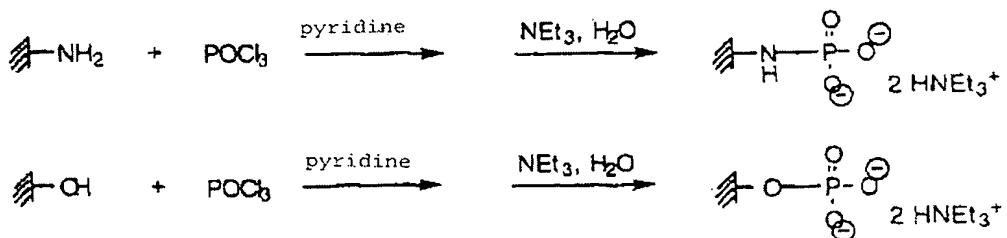
Re-derivatization to terminal hydroxyl:



Re-derivatization to terminal carboxyl:



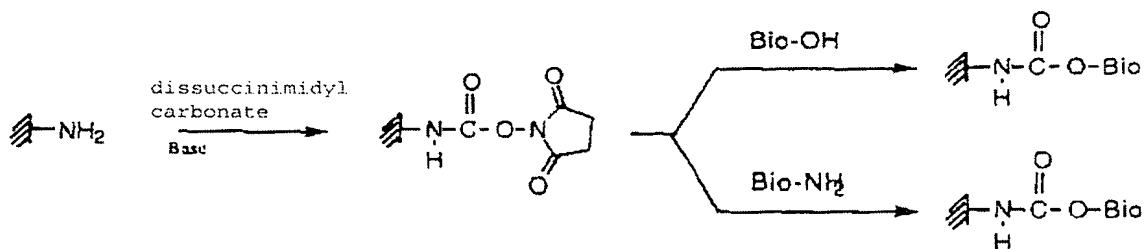
Re-derivatization to terminal phosphate:



(B) Binding of the biopolymer by means of cross-linkers

A covalent surface activation is understood to mean an activation in which cross-linkers are so to speak grafted as a terminal group onto the linker system built up according to the invention beforehand (flexible linker system). They are above all activated ester, aldehyde, imidoester or isothiocyanate functions which are capable of covalently binding without further chemical step to biopolymers dissolved in aqueous systems. Here, above all disuccinimidyl carbonate, disuccinimidyl oxalate, glutaraldehyde, dimethylsuberimidate dihydrochloride or phenylene diisothiocyanate have to be mentioned as the reagents to be chosen. The reaction is carried out preferably under basic conditions, i.e. with the addition of diisopropylethylamine or NaCO₃.

Principle:



[Bio-OH/Bio-NH₂ = hydroxyamino biomolecule]

The invention is further described by means of the figures in which:

Figure 1: shows the generation of dendrimer structures after activation with acryloylchloride

Figure 2: shows the generation of dendrimer structures after activation with 4-nitrophenylchloroformate

The invention is described in more detail by means of the examples.

Example 1: Derivatization of a glass support

It is started from aminated glass supports (40 x 48 mm) which is either commercially available or can be prepared according to the common methods of silanization. For activating the amino functions, the aminated glass supports are placed in 20 ml anhydrous dichloroethane with 200 mg 4-nitrophenyl chloroformate (1 mmol) and 171 μ l diisopropylethylamine (1 mmol) and swirled on a shaker for 2 hours. The BPB control test shows no blue staining. The glass supports are reacted overnight in 20 ml amine-free DMF with 223 μ l tetraethylene pentamine (1 mmol). The BPB control test shows a blue staining. For starting a new cycle, the glass supports are placed in 20 ml anhydrous dichloroethane with 200 mg 4-nitrophenyl chloroformate (1 mmol) and 171 μ l diisopropylethylamine (1 mmol) and swirled on a shaker for 2 hours. The BPB control test shows no blue staining. The glass supports are reacted overnight in 20 ml amine-free DMF with 140 μ l 1,4-bis(3-aminopropoxy)butane (1 mmol). The BPB test shows a blue staining.

The thus derivatized glass supports now have, on their surface, linkers to which biopolymers (e.g. nucleic acids) can be linked.

Example 2: Derivatization of a glass support

It is started from an aminated glass support (40 x 48 mm) which is either commercially available or can be prepared according to the common methods by means of silanization. For activating the amino functions, the aminated glass supports are placed in 20 ml anhydrous dichloroethane with 81 μ l acryloylchloride (1 mmol) and 171 μ l diisopropylethylamine (1 mmol) and swirled on a shaker for 2 hours. The BPB control test shows no blue staining. The glass supports are reacted for 2 nights in 20 ml amine-free DMF with 223 μ l tetraethylene pentamine (1 mmol). The BPB control test shows a blue staining. For starting a new cycle, the glass supports are placed in 20 ml anhydrous dichloroethane with 81 μ l acryloylchloride (1mmol) and 171 μ l diisopropylethylamine (1 mmol) and swirled for 2 nights on a shaker. The BPB control test shows no blue staining. The glass supports are reacted for 2 nights in 20 ml amine-free DMF with 140 μ l 1,4-bis(3-aminopropoxy)butane (1mmol). The BPB test shows a blue staining.

The thus derivatized glass supports then have, on their surface, linkers to which biopolymers (e.g. nucleic acids) can be linked.

Example 3: Derivatization of polypropylene membranes

It is started from a purchasable hydrophilized polypropylene membrane (8 x 12 cm). For the purpose of activation, the membrane is reacted with 324 μ l acryloylchloride (4 mmol) and 684 μ l diisopropylethylamine (4 mmol) in 30 ml anhydrous dichloroethane on a shaker. After 2 hours, the reaction solution is decanted and washed several times carefully with dichloroethane and dried. The bromophenol blue test (BPB test) shows no blue staining. The activated membrane is subsequently swirled for 2 days with 892 μ l tetraethylene pentamine (4 mmol) in 30 ml amine-free DMF on a shaker. Then, the reaction solution is decanted and the membrane is

washed carefully several times with DMF and then with dichloroethane and dried. The bromophenol blue test shows blue staining. For further activation the then aminated membrane is again reacted with 324 μ l acryloylchloride (4 mmol) and 684 μ l diisopropylethylamine (4 mmol) in 30 ml anhydrous dichloroethane on a shaker. After 2 hours, the reaction solution is decanted and washed several times carefully with dichloroethane and dried. The bromophenol blue test (BPB test) shows no blue staining. Thereafter, the activated membrane is swirled for 2 days with 560 μ l 1,6-bis(3-aminopropoxy)butane (4 mmol) in 30 mol amine-free DMF on a shaker. Then, the reaction solution is decanted and the membrane is washed carefully several times with DMF and then with dichloroethane and dried. The bromophenol blue test (BPB test) shows blue staining.

Example 4: Binding of nucleic acids to polypropylene membranes

A polypropylene membrane derivatized according to Example 3 (8 x 12 cm) is incubated on a Whatman filter paper for 5 min. with a solution of 54 mg N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride and 24 ml N-methyimidazole in 10 ml water. The reaction solution is decanted. The thus activated still moist polypropylene membrane can then be used for covalent application of biopolymers. After applying the biopolymers (e.g. by spotting robots or nano plotter), the samples are fixed on the membrane by 2 h of incubation at 65°C; thereafter the membrane is washed carefully with water.

Example 5: Synthesis of terminal hydroxyl groups

a) Activation with chloroformic acid-4-nitrophenyl ester: An amino-functionalized polypropylene membrane (omnitray size) according to Example 3 is swirled in 30 ml anhydrous dichloroethane with 400 mg chloroformic acid-4-nitrophenylester (2 mmol) and 342 μ l diisopropylethylamine

(2 mmol) for 2 hours on a shaker. Washing is carried out 2 x for 5 minutes each with 50 ml dichloromethane and drying takes place in a nitrogen current. The thus activated PP membrane is then swirled with 200 ml 2-(2-aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml amine-free DMF for 30 min. on a shaker. The reaction solution is then decanted. After short washing with DMF, the PP membrane is again mixed with 200 μ l 2-(2-aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml amine-free DMF and swirled overnight on a shaker. The reaction solution is decanted and the PP membrane is washed 2 times for 5 minutes each with 50 ml DMF and then 2 times with 50 ml acetone and is dried.

b) Activation with acryloylchloride:

An amino-functionalized polypropylene membrane (omnitray size) according to Example 3 is swirled in 30 ml anhydrous dichloroethane with 162 μ l acryloylchloride (2 mmol) and 342 μ l diisopropylethylamine (2 mmol) for 2 hours on a shaker. Washing is carried out 2 times for 5 minutes each with 50 ml dichloromethane and drying takes place in a nitrogen current. The thus activated PP membrane is then swirled with 200 μ l 2-(2-aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml amine-free DMF for 30 minutes on a shaker, whereupon the reaction solution is decanted. After short washing with DMF, the PP membrane is again mixed with 200 μ l 2-(2-aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml amine-free DMF and swirled overnight on a shaker. The reaction solution is decanted and the PP membrane is washed 2 times for 5 minutes each with 50 ml DMF and then 2 times with 50 ml acetone and is dried.

Example 6: Synthesis of terminal carboxyl groups

An amino-functionalized polypropylene membrane (omnitray size) according to Example 3 is reacted in 30 ml dry dichloroethane with 400 mg succinic anhydride (4 mmol), 1 ml pyridine (24 mmol) and 488 mg DMAP (4 mmol) overnight on a shaker. Subsequently, the reaction solution is decanted and the PP membrane is washed in succession with 30 ml dichloromethane, 30 ml acetone, 30 ml 1 % HCl, 2 x 30 ml

water and 2 x with 30 ml acetone for 5 minutes each and is dried.

Example 7: Synthesis of terminal phosphate groups

While cooling in an ice bath, 0.42 ml POCl₃ (4 mmol) is dissolved in 40 ml dry pyridine. Thereafter, 828 mg 1,2,4-triazole (12 mmol) are added. After 10 minutes, the hydroxyl-functionalized polypropylene membrane according to Example 4 is added and swirled for another 10 minutes with ice bath cooling on a shaker. Thereafter, the ice bath is removed and swirling is continued for 45 minutes. The reaction solution is decanted and carefully hydrolyzed with 50 ml of a mixture of triethylamine / dioxane / water. Washing is carefully carried out two times one after the other with 50 ml water, shortly with 50 ml 1 % HCl, 2 times with 50 ml water and 2 times for 5 minutes each with 50 ml acetone and drying takes place in a nitrogen current.

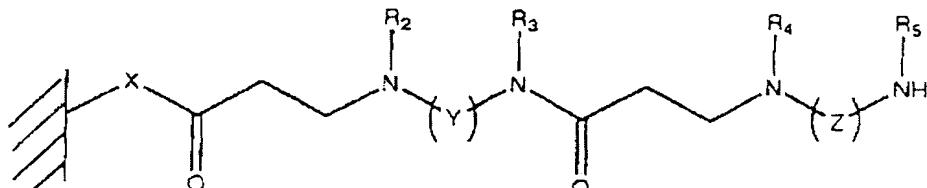
Example 8: Surface activation with disuccinimidyl carbonate

7 amino-functionalized glass slides are swirled in 30 ml anhydrous acetonitrile with 256 mg disuccinimidyl carbonate (2 mmol) and 513 μ l diisopropylethylamine (3 mmol) for 4 hours on a shaker. Washing is carried out with 50 ml acetonitrile, then with 50 ml dichloroethane and drying takes place in a nitrogen current.

Claims

- 1) A method of derivatizing carriers or supports, wherein a functional group is activated on a carrier or support surface by reaction with an activating reagent and subsequently reacted with an amine component.
- 2) The method according to claim 1, wherein the supports are selected from the group consisting of glass, sheets or films or membranes made from polypropylene, nylon, cellulose, cellulose derivatives (e.g. cellulose acetate, cellulose-mixed ester), polyether sulfones, polyamides, polyvinyl chloride, polyvinylidene fluoride, polyester, polyethylene or Teflon.
- 3) The method according to claim 1 or 2, wherein the functional group is an amine, hydroxyl, phosphate, carboxyl, carbonyl, thiol or amide group.
- 4) The method according to any one of claims 1 to 3, wherein the activating reagent is acryloylchloride, 4-nitrophenylchloroformate, carbonyl diimidazole, phenyl chloroformate, phosgene, disphosgene, triphosgene, EDC-(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride), N,N'-diisopropyl carbodiimide, dicyclohexyl carbodiimide, disuccinimidyl carbonate, disuccinimidyl oxalate, dimethylsuberimidate dihydrochloride or phenylene diisothiocyanate.
- 5) The method according to any one of claims 1 to 4, wherein the amine component is selected from the group consisting of monoamines, bis-amines or polyamines.
- 6) The method according to claim 5, wherein the monoamine is 2-aminoethanol, 6-amino-1-hexanol, 2-(4-aminophenyl)ethanol, 5-amino-n-valeric acid, 2-(2-aminoethoxy)ethanol or 3-amino-1,2-propanediol.

- 7) The method according to claim 5, wherein the bis-amine is 1,4-bis(3-aminopropoxy)butane, O,O'-bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol 500 (= Jeffamine 500), O,O'-bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol 130 (= Jeffamine 130), 4,7,10-trioxa-1,13-tridecaneamine or ethylene diamine.
- 8) The method according to claim 5, wherein the polyamine is tetraethylene pentamine, spermine, spermidine, 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine or 4-aminomethyl-1,8-octanediamine.
- 9) The method according to any one of claims 1 to 8, wherein the steps of the reaction with an activating reagent and an amine component are carried out several times.
- 10) The method according to claim 9, wherein dendrimer structures are built up on the support surface.
- 11) The method according to any one of the preceding claims, wherein positive charge is built up in controlled fashion on the support surface.
- 12) The method according to any one of claims 1 to 11, wherein the support surface derivatized according to any one of claims 1 to 11 is additionally activated prior to the attachment of biopolymers.
- 13) The method according to claim 12, wherein disuccinimidyl carbonate, disuccinimidyl oxalate, glutaraldehyde, dimethyl dihydrochloride or phenylene diisothiocyanate are used as activation agent.
- 14) A support suitable for the attachment of biopolymers, wherein the surface of the support includes linkers having the following structure:



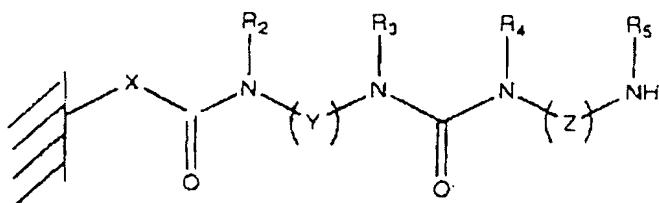
X = O, NHR₁

X = O, NHR₁
 Y, Z = may be equal or different and be selected from
 - (CH₂)_n -
 - (CH₂CH₂O)_n - CH₂CH₂
 - (CH₂CH₂CH₂O)_n - CH₂CH₂CH₂ - , etc.

R₁-R₅ = may be equal or different and be selected from a straight-chain or branched alkyl residue having 1 to 30 carbon atoms, straight-chain or branched alkenyl residue having 2 to 30 carbon atoms, monocyclic or polycyclic alkyl residue having 3 to 30 carbon atoms or monocyclic or polycyclic alkenyl residue having 4 to 30 carbon atoms or monocyclic or polycyclic residue having 6 to 30 carbon atoms, the residues being optionally substituted by one or several substituents (e.g. OH, carboxyl, carbonyl, phosphate)

n = 1 to 50

or



X = O, NHR₁
Y, Z = may be equal or different and be selected from
- (CH₂)_n-
- (CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂
- (CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂-, etc.
R₁-R₅ = may be equal or different and be selected from a straight-chain or branched alkyl residue having 1 to 30 carbon atoms, straight-chain or branched alkenyl residue having 2 to 30 carbon atoms, monocyclic or polycyclic alkyl residue having 3 to 30 carbon atoms or monocyclic or polycyclic alkenyl residue having 4 to 30 carbon atoms or monocyclic or polycyclic residue having 6 to 30 carbon atoms, the residues being optionally substituted by one or several substituents (e.g. OH, carboxyl, carbonyl, phosphate)
n = 1 to 50

- 15) The support suitable for the attachment of biopolymers, which includes linkers in the form of dendrimer structures on its surface.
- 16) Use of a support produced according to any one of claims 1 to 11 or a support according to claim 14 or 15 for the attachment of biopolymers.
- 17) Use according to claim 16, wherein the biopolymers are selected from DNA, RNA, nucleotide analogs, peptides, proteins or antibodies.

Abstract of the Disclosure

The present invention relates to a process for derivatizing supports or carriers, wherein a functional group is activated on a support surface by reaction with an activating reagent and then reacted with an amine component. The invention also relates to a support with a dendrimer structure on its surface and to the use of a support that has been produced according to the invention for binding biopolymers.

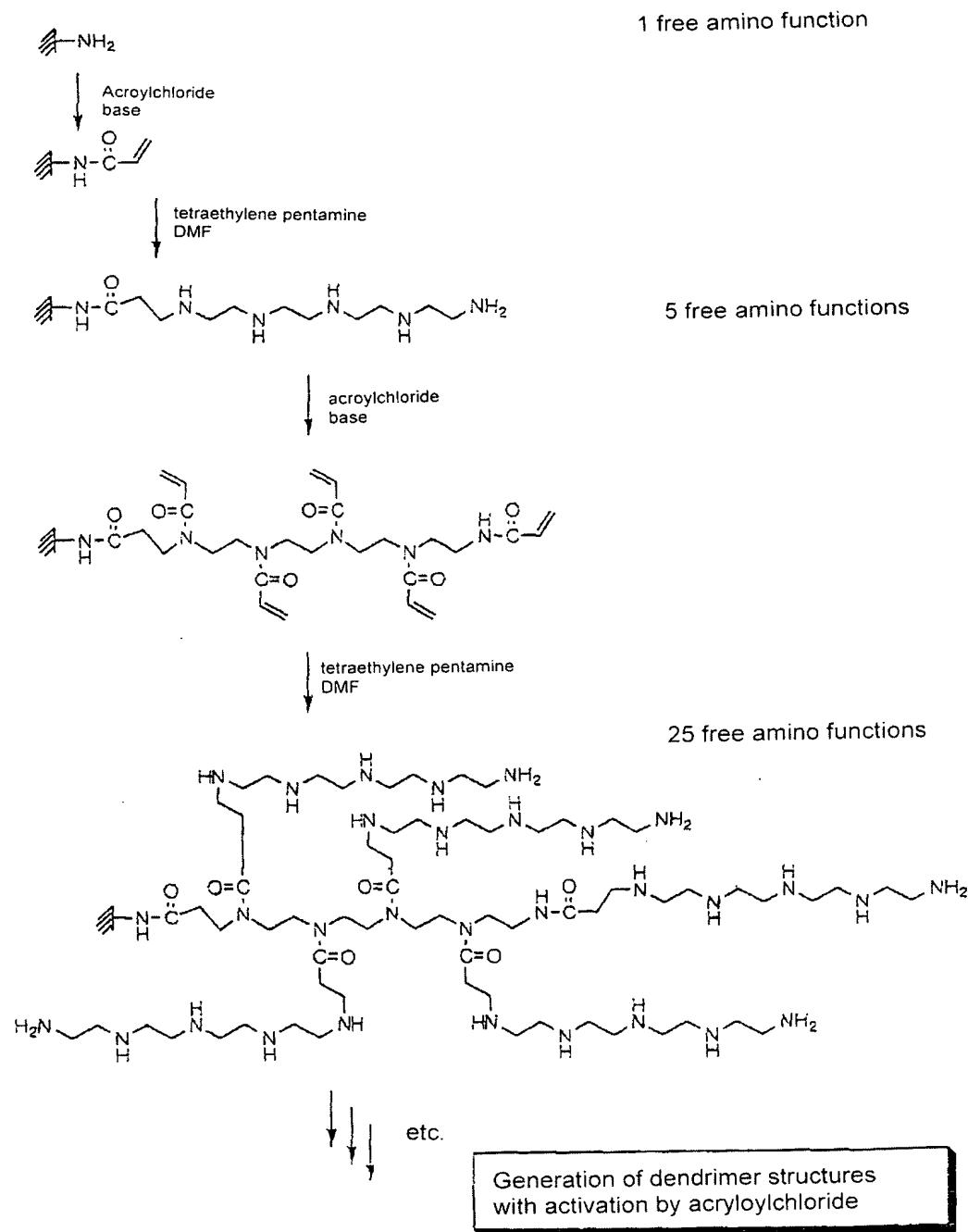


Fig. 1

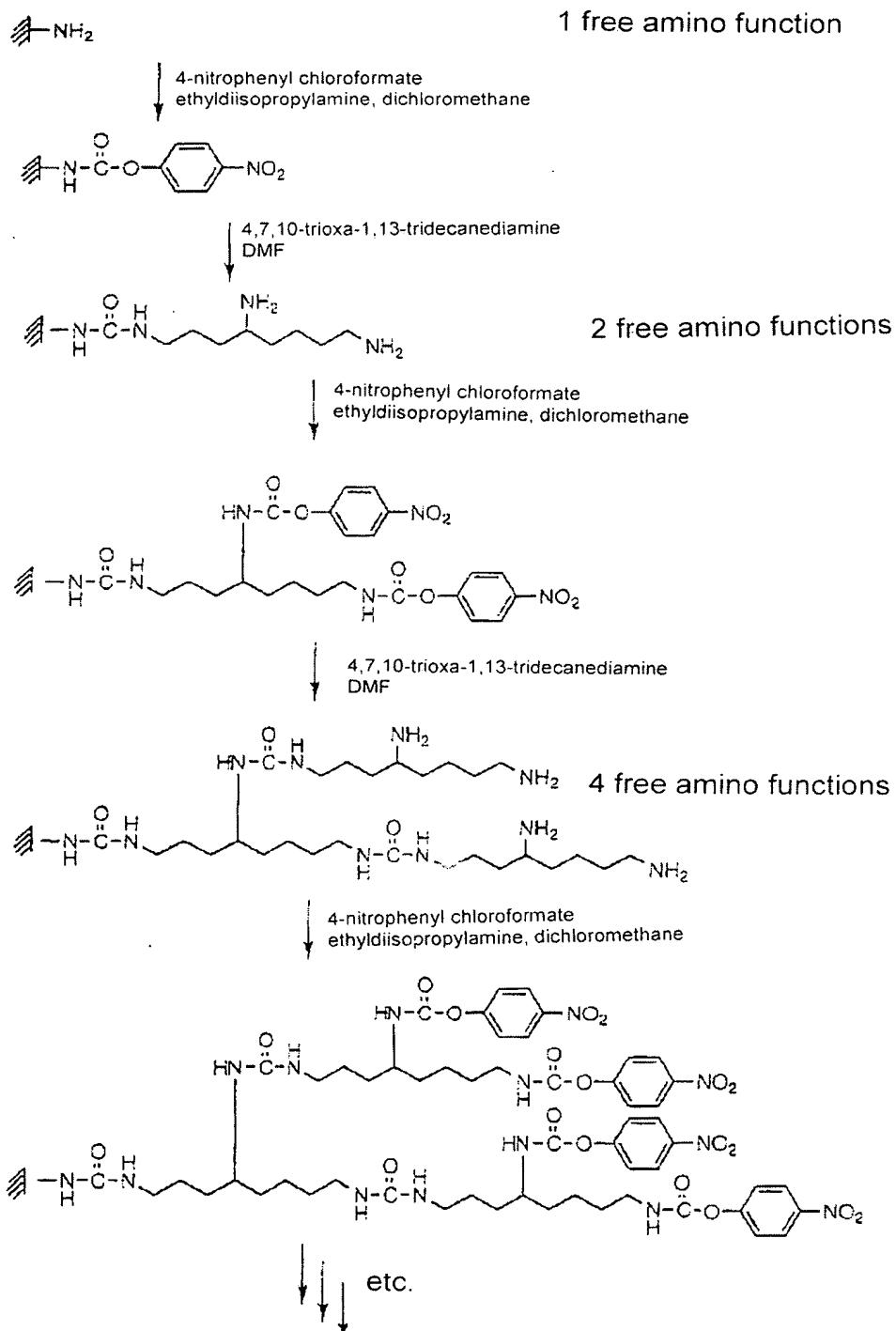


Fig. 2

Generation of dendrimer structures with activation by 4-nitrophenyl chloroformate

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2596 - sch / msl

Derivatisierung von Trägeroberflächen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Derivatisierung von Trägeroberflächen sowie dadurch derivatisierte Trägeroberflächen.

Die Anbindung von Biopolymeren, insbesondere Nukleinsäuren, an feste Trägeroberflächen wird bis heute im allgemeinen durch folgende Alternativen erreicht:

- 10 1) Aufbringen von Biopolymeren (z.B. Nukleinsäuren) auf Oberflächen:
Hier finden vor allem poly-L-Lysin gecoatete Glasträger und Nylon-Membranen Verwendung. Dabei werden die Biopolymere durch Ladung an den Träger gebunden. Nachteilig bei der Verwendung poly-L-Lysin gecoateter Glasträger ist, daß keine kovalente Anknüpfung zwischen der beschichteten Oberfläche und dem Biopolymer stattfindet. Der Träger kann nur einmalig verwendet werden. Weiter gibt es so gut wie keine Möglichkeiten zur Optimierung des Abstandes zwischen Biopolymer und Träger. Nachteilig bei der Verwendung von Nylonmembranen ist, daß die Biopolymere größtenteils auch nur durch Ladung gebunden werden. Der Träger kann zwar mehrmals verwendet werden, aber es ist auch keine Optimierung des Abstandes zwischen Biopolymer und Träger möglich.
- 20 2) In-situ Aufbau von Biopolymere (z.B. Nukleinsäuren) auf Oberflächen:
Hier finden gebräuchliche Linkersysteme, die von der Biopolymersynthese an porösen CPG-Materialien herrühren, Verwendung. Bei den verwendeten Linker-Molekülen handelt es sich meist um Polyethylenglykol, insbesondere Tetra- oder Hexaethylenglykol. Die Linkermoleküle werden üblicherweise durch kostenintensive Reagenzien analog der Phosphoramidit-Chemie

17. November 1998

- 2 -

aufgebracht. Es kann leider keine Massenherstellung stattfinden und das Aufbringen von Ladungen ist nicht möglich.

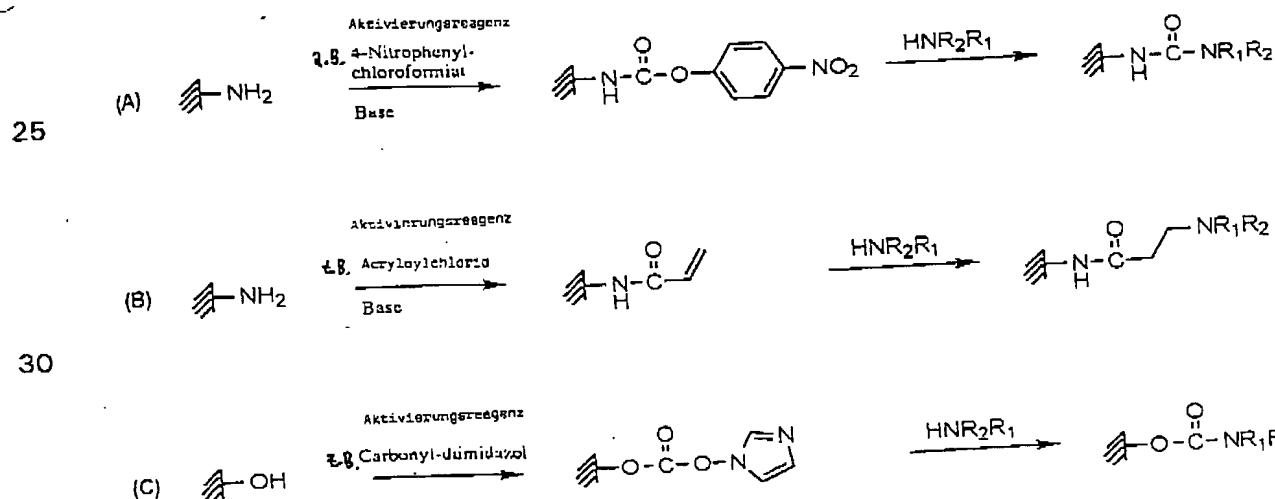
Weiter haben diese Verfahren alle den Nachteil, daß es ihnen an Flexibilität mangelt, und die Biopolymere können auf der Oberfläche nur in einer sehr begrenzten Anzahl aufgebracht werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht nun darin, ein Verfahren bereitzustellen, das eine optimale Anbindung von einer großen Anzahl Biopolymeren an Trägeroberflächen erlaubt. Die Aufgabe besteht weiter darin, eine Trägeroberfläche bereitzustellen, deren Bindungskapazität auf ein Vielfaches durch Durchführen einer Oberflächenmodifikation gesteigert worden ist.

Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

15 Insbesondere wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gelöst, bei dem eine funktionelle Gruppe auf einer Trägeroberfläche durch ein Aktivierungsreagenz aktiviert und nachfolgend mit einer Amin-Komponente umgesetzt wird.

20 Dem erfindungsgemäßen Verfahren liegen bevorzugt folgende Synthese-Prinzipien zugrunde:



17. November 1998

- 3 -

wobei R₁ und R₂ gleich oder verschieden sein können. Die Bedeutungen von R₁ und R₂ unterliegen keiner Beschränkung und können H oder jeglicher organischer Rest sein (z.B. ein gerader oder verzweigter Alkylrest mit 1-30 Kohlenstoff-
5 atomen, ein gerader oder verzweigter Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoff-
atomen, ein mono- oder polzyklischer Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen
oder ein mono- oder polzyklischer Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen
oder einen mono- oder polzyklischen Rest mit 6 bis 30 Kohlenstoffatomen,
10 wobei die Reste ggf. durch einen oder mehrere Substituenten (z.B. OH, Carbox-
yl, Carbonyl, Phosphat-) substituiert sein können). Die Base kann jegliche basi-
sche Verbindung sein, z.B. Diisopropylethylamin.

Es kann jeder beliebige gerade oder verzweigte C₁₋₃₀-Alkylrest verwendet werden. Beispiele hierfür sind Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-,
15 tert.-Butyl-, n-Butyl-, n-Hexyl-, 2-Methylpentyl-, 2,3-Dimethylbutyl-, n-Heptyl-,
2-Methylhexyl-, 2,2-Dimethylpentyl-, 3,3-Dimethylpentyl-, 3-Ethylpentyl-, n-
Octyl-, 2,2-Dimethylhexyl-, 3,3-Dimethylhexyl-, 3-Methyl-3-ethylpentylgruppen.
Bevorzugt sind kurze Alkylketten, wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Isopropyl-.

20 Es kann jeder beliebige gerade oder verzweigte C₂₋₃₀-Alkenylrest verwendet werden. Beispiele hierfür sind Vinyl-, Propenyl-, Isopropenyl-, Allyl-, 2-Methylal-
lyl-, Butenyl- oder Isobutenyl-, Hexenyl- oder Isohexenyl-, heptenyl- oder Isohep-
tenyl-, Octenyl- oder Isooctenylgruppen. Bevorzugt sind Vinyl-, Propenyl- und
Isopropenyl-.

25 Der Cycloalkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen kann jeder beliebige Cycloal-
kylrest sein. Beispiele hierfür sind eine Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl-
oder Cyclohexyl-, Cycloheptyl-, Cyclooctyl-, Cyclononyl- oder Cyclodecylgrup-
pen. Bevorzugt sind Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl- und Cyclohexyl-.

30 Der Cycloalkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen kann jeder beliebige
Cycloalkenylrest sein. Beispiele hierfür sind eine Cyclobutenyl-, Cyclopentenyl-

17. November 1998

- 4 -

oder Cyclohexenyl-, Cycloheptenyl-, Cyclooctenyl-, Cyclononenyl- oder Cyclodecenylgruppen. Bevorzugt sind Cyclobutenyl-, Cyclopentenyl- oder Cyclohexenyl.

Beispiele für polyzyklische Alkyl- bzw. Alkenylreste umfassen Norbornan, Adam-

5 antan oder Benzvalen.

R₁ und R₂ können ferner beliebige mono- oder polycyclische C6-30- Arylreste sein. Beispiele hierfür sind ein carbocyclischer, monocyclischer Rest, beispielsweise die Phenylgruppe, ein heterocyclischer, monocyclischer Rest, beispielsweise die Gruppen Thienyl, Furyl, Pyranyl, Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Pyridyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazinyl, Thiazolyl, Oxazolyl, Furazannyl, Pyrrolinyl, Imidazolinyl, Pyrazolinyl, Thiazolinyl, Triazolyl, Tetrazolyl, sowie die Positions-isomeren des oder der Heteroatome, die diese Gruppen umfassen können.

15 Durch das erfindungsgemäße Verfahren entstehen an der Trägeroberfläche mehr oder weniger vernetzte Linkersysteme, die die Anbindung einer ggf. großen Anzahl von Biopolymeren an die Trägeroberfläche erlauben. Bevorzugte Biopolymere sind DNA, RNA, Nucleinsäureanaloge, Peptide, Proteine, Antikörper etc.

20 Erfindungsgemäß soll unter einer funktionellen Gruppe eine auf einer Trägeroberfläche befindliche chemische Gruppierung, wie z.B. eine Amino-Gruppe, Hydroxyl-Gruppe, Carboxyl-Gruppe, Carbonyl-Gruppe, Thiol-, Amid- oder Phosphat-Gruppe verstanden werden.

25 Erfindungsgemäß ist jegliche(r) auf diesem Gebiet übliche Träger bzw. Matrix einsetzbar. Dies sind insbesondere Glas, Folien bzw. Membranen aus Polypropylen, Nylon, Cellulose, Cellulosederivate (z.B. Celluloseacetat, Cellulose-Mischester), Polyethersulfonen, Polyamiden, Polyvinylchlorid, Polyvinylidenfluorid, Polyester, Teflon oder Polyethylen.

30 Erfindungsgemäß soll unter einem Aktivierungsreagenz ein Reagenz verstanden werden, das auf der Trägeroberfläche befindliche funktionelle Gruppen in einen

17. November 1998

- 5 -

ankopplungsbereiten Zustand versetzt. Bevorzugte Aktivierungsreagenzien sind 4-Nitrophenyl-Chloroformiat (= Chlorameisensäure-4-nitrophenylester), Carbonyldiimidazol, Acryloylchlorid (Acrylsäurechlorid), Phenylchloroformiat, Phosgen, Diphosgen, Triphosgen, EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid), N,N'-Diisopropyl-carbodiimid, Dicyclohexyl-carbodiimid, Disuccinimidyl-carbonat, Disuccinimidyl-oxalat, Dimethylsuberimidatdihydrochlorid oder Phenylendiisothiocyanat, wobei die drei erstgenannten am bevorzugtesten sind.

Erfindungsgemäß sollen unter einer Amin-Komponente Monoamine, Bis-Amine oder Polyamine verstanden werden. Bevorzugte Monoamine sind 2-Aminoethanol, 6-Amino-1-hexanol, 2-(4-Aminophenyl)-ethanol, 5-Amino-n-valeriansäure, 2-(2-Aminoethoxy)ethanol, 3-Amino-1,2-propandiol; bevorzugte Bis-Amine sind 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan, O,O'-Bis(2-aminopropyl)polyethylenglykol 500 (= Jeffamin 500), O,O'-Bis(2-aminopropyl)polyethylenglykol 130 (= Jeffamin 130), 4,7,10-Trioxa-1.13-tridecanamin, Ethylendiamin, N-Methylimidazol, Diisopropylethylamin; und bevorzugte Polyamine sind Tetraethylpentamin, Spermin, Spermidin, 4,7,10-Trioxa-1.13-tridecandiamin, 4-Aminomethyl-1,8-octandiamin. Durch den Einbau von Aminen können bevorzugt positive Ladungen in das Linkersystem implementiert werden, da diese im physiologischen Bereich protoniert vorliegen. Durch die Wahl des entsprechenden Amins lässt sich der Grad der Ladung der Oberfläche steuern. Positive Ladungen ihrerseits bewirken eine leichtere Annäherung von negativ geladenen Biopolymeren (z.B. Nukleinsäuren) und erleichtern dadurch Hybridisierungen auf den erfindungsgemäß behandelten Trägeroberflächen. Bei der Verwendung von Bis-Aminen oder Polyaminen kann die Kettenlänge, d.h. die Länge des Linker-Systems, durch die Länge des Amins und die Anzahl des wiederholten Durchlaufens der nachfolgend angegebenen Synthese-Prinzipien gesteuert werden. Durch die Wahl des Amins kann der individuelle Charakter des Linker-Systems gesteuert werden, d.h. ob es eher hydrophob oder hydrophil ist. Durch die Wahl des Amins können neben Amingruppierungen natürlich auch andere funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Phosphat-, Carboxyl-, Carbonyl-) auf der Oberfläche präsentiert werden. So ist es beispielsweise für die Einführung eines OH-Gruppen tragenden Linkers vor-

17. November 1998

- 6 -

teilhaft die Umsetzung mit einem Aminalkohol durchzuführen. Bei Verwendung eines bifunktionellen Amins erfolgt eine lineare Verlängerung der Kette. Durch polyfunktionelle Amin-Reagentien werden in das Linkersystem Verzweigungen eingebaut. Dadurch werden sogenannte Dendrimer-Strukturen aufgebaut (s. Fig. 5 1 und 2). Unter einer Dendrimer-Struktur soll erfindungsgemäß verstanden werden, daß von einem definierten Startpunkt ausgehende mehr als einmal verzweigte Strukturen entstehen. Dies hat vor allem den Vorteil, daß bei Trägermaterialien mit ansonsten geringer Beladungskapazität (z.B. Glas) die Beladung 10 gezielt erhöht werden kann und somit größere Mengen an Biopolymeren aufgebracht werden können. So können bei der Verwendung von polyfunktionellen Aminen (m = Anzahl der Amino-Funktionen) nach n Runden (1 Runde = Zyklus aus Aktivierung und Umsetzung mit Amin) \times Positionen (Funktionen) für eine Anbindung von Biopolymeren genutzt werden:

15 $x = (m-1)^n$ (im Falle der Aktivierung mit 4-Nitrophenyl-Chloroformiat oder Carbonyldiimidazol)

$x = m^n$ (im Falle der Aktivierung mit Acryloylchlorid)

20 Rechenbeispiel: Tetraethylenpentamin ($m = 5$), 3 Runden ($n = 3$), Acryloylchlorid als Aktivierungsmittel $\rightarrow 5^3 = 125$, d.h. 125-fache Beladungskapazität des Trägers

25 Um auf der Trägeroberfläche zu einem mehr oder weniger vernetzten Linkersystem zu kommen, werden die obigen Reaktionen gezielt wiederholt. Hierdurch wird der Abstand zwischen Trägermaterial und dem anzubindenden Biopolymer gesteuert und auch die physikalischen Eigenschaften des Linkers bestimmt. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird ein flexibles Linkersystem geschaffen. Flexibel insofern, daß für jegliche Anwendung (z.B. Anbindung von DNA, 30 RNA, Proteine, Antikörper) ideal vorbereitete Trägeroberflächen zur Verfügung gestellt werden. Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren dazu, für die DNA-/Bio-Chip-Technologie geeignete Oberflächen (Träger) bereit-

17. November 1998

- 7 -

zustellen. Der Grad der positiven Ladung auf der Oberfläche lässt sich durch die Anzahl der protonierbaren Amin-Funktionen, vor allem durch den Einbau von Polyaminen, steuern. So wird das Ziel der Erhöhung der Beladungsdichte vorzugsweise durch den Einbau von Verzweigungsstellen (z.B. Polyaminen) realisiert; die Erhöhung der positiven Oberflächenladung kann beispielsweise durch den Einbau protonierbarer Amino-Funktionen geschehen; die Variation der Distanz zwischen Biomolekül und Oberfläche kann durch die Verwendung Amine verschiedener Kettenlänge gesteuert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Oberflächenmodifizierung zeichnet sich durch folgende Schritte aus. Die zu derivatisierenden Trägermaterialien werden in einem Reaktionsgefäß mit 5-100 ml (je nach Größe), bevorzugt 10-30 ml, ganz bevorzugt 20 ml, wasserfreiem Lösungsmittel (z.B. Dichlorethan, Tetrachlorkohlenstoff, THF, DMF, DMSO, HMPT (=HMPA), Dichlorethan, Acetonitril) mit ca. 0,5 bis 5 mmol, bevorzugt 1-3 mmol, ganz bevorzugt 1 mmol, Aktivierungsreagenz (z.B. Acryloylchlorid, 4-Nitrophenylchloroformiat, Carboonyldimidazol) versetzt. Die Umsetzung wird im Falle von Acryloylchlorid und 4-Nitrophenyl-chloroformiat durch Zugabe von ca. 0,5 bis 5 mmol, bevorzugt 1-3 mmol, ganz bevorzugt 1 mmol, Diisopropylethylamin (oder einer anderen nicht nukleophilen Base, wie Triethylamin, Pyridin, Collidin, Lutidin oder Triisopropylamin) gestartet. Nach 1 bis 4 Stunden, bevorzugt 2 Stunden, Schwenken auf einem Schüttler werden die Träger gründlich mit einem wasserfreien Lösungsmittel (z.B. Dichlorethan, Tetrachlorkohlenstoff, etc.) gewaschen und trocknen gelassen, vorzugsweise mit Stickstoff trockengeblasen. Zur Überprüfung der Reaktion wird eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Beispielsweise wird das oben erwähnte aminierte PP-Kontrollstück dem nachfolgend beschriebenen Bromphenolblau-Test unterzogen. Ist keine Blaufärbung im Vergleich zu einer nicht umgesetzten Probe zu erkennen, ist die Aktivierung erfolgreich verlaufen. Tritt eine Blaufärbung auf, wird die Umsetzung wiederholt. Die nun aktivierten Trägermaterialien werden in ca. 5-100 ml (je nach Größe), bevorzugt 10-50 ml, ganz bevorzugt 20 ml eines amin- und wasserfreien Lösungsmittels (z.B. DMF, Acetonitril, THF, DMSO, HMPT (HMPA) oder Dichlormethan) mit ca. 0,5-5 mmol,

17. November 1998

- 8 -

bevorzugt 1-3 mmol, bevorzugt 1 mmol, Amin-Komponente versetzt und ca. 5 - 20 Stunden, bevorzugt über Nacht, geschwenkt. Man wäscht gründlich, z.B. nacheinander mit DMF, Methanol und Dichlorethan, und lässt die nun derivatisierten Träger trocknen bzw. bläst vorzugsweise mit Stickstoff trocken. Im Falle von mit Acryloylchlorid aktivierten Trägern empfiehlt sich eine auf 1,5 bis 2,5 Tage, bevorzugt 2 Tage, verlängerte Reaktionszeit. Zur Überprüfung der Reaktion wird eine Qualitätskontrolle durchgeführt, beispielsweise wird das oben erwähnte PP-Kontrollstück dem nachfolgend beschriebenen Bromophenolblau-Test unterzogen. Ist die Blaufärbung im Vergleich zu einer aktivierten Probe des letzten Schritts zu erkennen, ist die Umsetzung erfolgreich verlaufen. Bei keiner oder sehr schwacher Blaufärbung wird die Umsetzung wiederholt. Die nun einmal derivatisierten Träger können bereits so verwendet werden oder noch ein- oder mehrmals dem beschriebenen Zyklus unterzogen werden.

15 Zur Qualitätsüberprüfung der Trägerderivatisierung eignet sich beispielsweise ein Verfahren basierend auf der Blaufärbung von Aminofunktionen durch Bromphenolblau, d.h. die Detektion erfolgt über das Verschwinden bzw. Vorhandensein der Blaufärbung bei Aktivierung bzw. Umsetzung mit Aminen. Dazu wird jedem Reaktionsgefäß zusätzlich zu den zu derivatisierenden Trägermaterialien ein 20 Stück aminierte Polypropylen-Folie (PP-Kontrollstück) beigefügt, an der stellvertretend für alle in dem Reaktionsgefäß befindlichen Trägermaterialien der Erfolg des jeweiligen Reaktionsschritts überprüft wird. Hierzu wird nach jeder Reaktion ein Stück des Kontrollstreifens entnommen und 2 Minuten in einer 1% Bromphenolblau-Lösung in aminfreiem DMF geschwenkt und dann mit Ethanol gewaschen. Amino-Funktionen und andere basische Gruppen ergeben hierbei eine intensive adsorptive Blaufärbung. Nach der Durchführung der Aktivierungsreaktionen (z.B. mit Acryloylchlorid, 4-Nitrophenylchloroformiat, Carbonyldimidazol) wird auf Verschwinden der Blaufärbung detektiert. Eine Quantifizierung der Oberflächenbeladung ist über UV-Spektroskopie möglich. Hierbei wird die adsorptive Blaufärbung z.B. mit einer 10%-igen Piperidin-Lösung in DMF von 25 Träger abgelöst und UV-spektroskopisch vermessen.

30

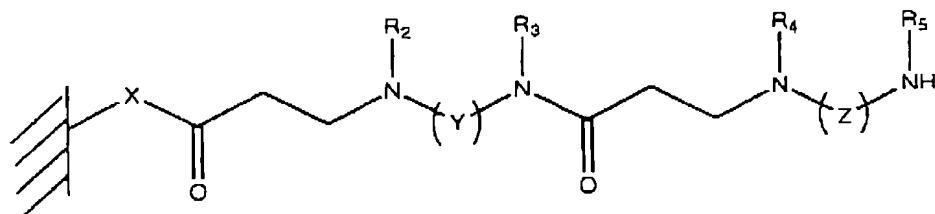
17. November 1998

- 9 -

Die Linker an der Trägeroberfläche weisen lineare Strukturen oder Dendrimer-Strukturen auf. Die Strukturen haben folgenden Aufbau:

- bevorzugte Struktur nach Aktivierung mit Acryloylchlorid

5



10

X = O, NHR₁

Y, Z = können gleich oder verschieden sein und können ausgewählt sein aus

-(CH₂)_n --(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-(CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂- usw.15 R₁-R₅ = können gleich oder verschieden sein analog R₁ und R₂ vorstehend

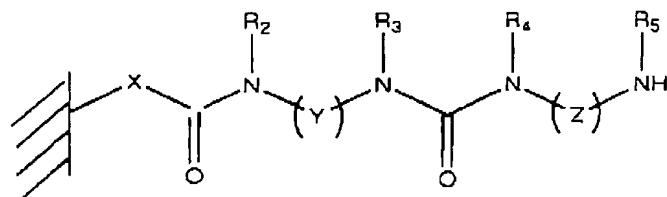
n = 1-50, bevorzugt 1-20, ganz bevorzugt 1-10

20

oder

- bevorzugte Struktur nach Aktivierung mit Chlorameisensäure-nitro-phenylester bzw. Carbonyldiimidazol

25



30

X = O, NHR₁

Y, Z = können gleich oder verschieden sein und können ausgewählt sein aus

17. November 1998

- 10 -

-(CH₂)_n -
 -(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂
 -(CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂- usw.

R₁-R₅ = können gleich oder verschieden sein
 5 analog R₁ und R₂ vorstehend
 n = 1-50, bevorzugt 1-20, ganz bevorzugt 1-10

Bei der Fixierung von Biopolymeren an die mit dem Linkersystem derivatisierten
 10 Trägeroberfläche können prinzipiell 2 Fälle (a) und (b) unterschieden werden :

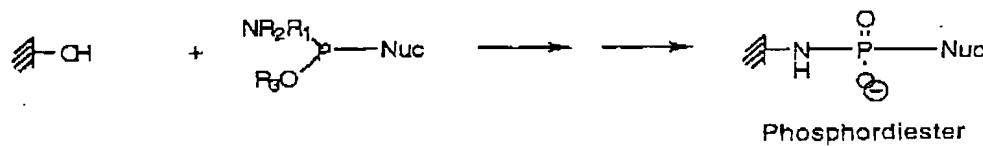
(a) In situ-Synthese von Biopolymeren (am Beispiel der Oligonukleotidsynthese):

15 Die derivatisierten Träger-Oberflächen mit endständigen Amino- oder Hydroxyl-Funktionen bedürfen keiner weiteren Modifizierung zur Anbindung des 1. Oligonucleotidbausteins nach der Phosphoramidit- oder auch Phosphotriester-Methode. Es werden nach der Reaktion des 1. Nucleotid-Reagenzes mit der aminierten
 20 Oberfläche Bindungen vom Phosphoramidat-Typ erzeugt. Hydroxylierte Oberflächen führen zu Bindungen vom Phosphodiester-Typ.

Phosphoramidit-Methode :

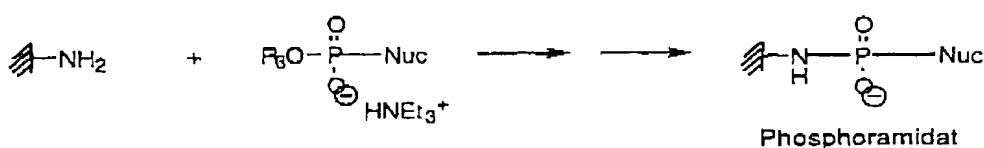


Phosphoramidat



Phosphodiester

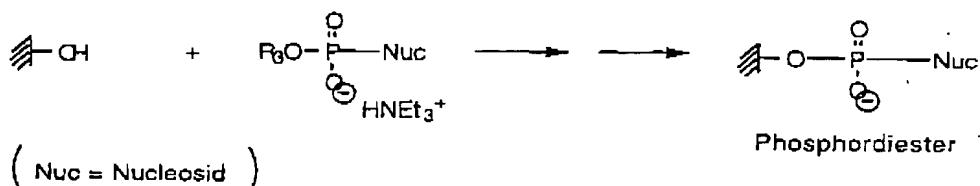
30 Phosphotriester-Methode :



Phosphoramidat

17. November 1998

- 11 -

5 R₁ - R₃ = analog R₁ und R₂ vorstehend

Werden Bindungen vom Phosphodiester-Typ angestrebt, genügt es beim letzten Schritt innerhalb der Linker-System-Synthese kein Bis-Amin, sondern einen Amino-Alkohol zur Reaktion zu bringen.

10

(b) Anbindung von "vorgefertigten" Biopolymeren:

15 Die Anbindung des Biopolymeren sieht die Generierung einer kovalenten (dau-erhaften) chemischen Verknüpfung des Biomoleküls mit der Trägeroberfläche vor. Hierzu muß eine chemische Bindung zwischen dem Biomolekül und der

Oberfläche erzeugt werden. Um diese Bindung zu erzeugen, kommt beispiels-

weise folgendes Vorgehen in Frage:

- (A) Zugabe eines Förderungsmittels
- (B) Aktivierung einer der beiden Reaktanden (Biomolekül oder Oberfläche). Allerdings ist eine Aktivierung der Trägeroberfläche gegenüber einer Aktivierung des Biomoleküls vorzuziehen, da bei der Aktivierung des Biomoleküls selbst unerwünschte Kreuzreaktionen zwischen den aktivierte Biomolekülen - aufgrund des meist poly-funktionellen Charakters des Biomoleküls - nicht auszuschliessen sind. Diese Aktivierung der Oberfläche erfolgt vorzugsweise mittels Crosslinker.

(A) Anbindung des Biopolymeren unter Zuhilfenahme eines Förderungsmittels

30 Die Möglichkeit ein Förderungsmittel (Katalysator) zur Erzeugung der kovalenten Bindung zwischen Oberfläche und Biomolekül zu benutzen, stellt im wesentlichen eine 3-Komponenten-Reaktion dar. Werden wie in der vorliegenden Erfindung Möglichkeiten angestrebt, die es erlauben sollen, hochparallel eine grosse

17. November 1998

- 12 -

Anzahl von Biopolymeren an exakt vorbestimmten Positionen auf einem Träger zu fixieren, kann dies aufgrund von Kreuz-Kontamination nur erschwert mit einem 3-Komponenten-System an ebenen Oberflächen (Folien, Glas o.ä.) gelingen. Daher stellt die Förderungsmittel-Methode einen Spezial-Fall zur kovalenten Anknüpfung von Biopolymeren auf Oberflächen vom Membran-Typ dar. Einzig hier kann das Förderungsmittel in den Poren der Membran lokal dem zu bindenden Biomolekül zur Verfügung gestellt werden, ohne daß mit Kreuz-Kontamination zu rechnen ist (vgl. Beispiel 4). Als Förderungsmittel eignen sich beispielsweise Reagentien vom Carbodiimid-Typ, wie Diisopropylcarbodiimid, EDC oder DCC (Dicyclohexylcarbodiimid). Desweiteren sollten die endständigen Gruppen auf dem Träger und am Biomolekül bevorzugt orthogonal zueinander sein, d.h. diese sollten sinnvoll eine chemische Bindung eingehen können. Hierbei ergeben sich vorzugsweise folgende Kombinationen der zu reagierenden Endgruppen:

15

<u>Träger-Oberfläche</u>	<u>Biomolekül</u>	<u>resultierender Bindungs-Typ</u>
Amino (-NHR)	Carboxy (-COOH)	Amid-Bindung
Amino (-NHR)	Phosphat (-PO ₄ ²⁻)	Phosphoramidat
20 Hydroxyl (-OH)	Carboxy (-COOH)	Ester
Hydroxyl (-OH)	Phosphat (-PO ₄ ²⁻)	Phosphordiester
Carboxy (-COOH)	Amino (-NHR)	Amid-Bindung
Carboxy (-COOH)	Hydroxyl (-OH)	Ester
Phosphat (-PO ₄ ²⁻)	Amino (-NHR)	Phosphoramidat
Phosphat (-PO ₄ ²⁻)	Hydroxyl (-OH)	Phosphordiester

25

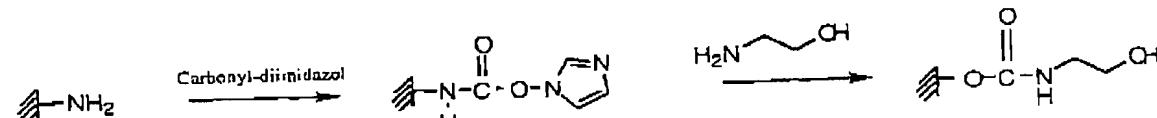
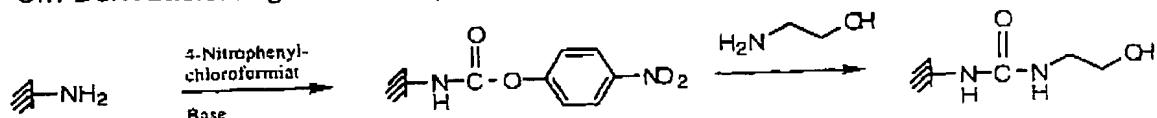
Da die reaktiven Gruppen (Amin-, Hydroxyl-, Phosphat- oder Carboxyl-) mehr oder weniger vom Biomolekül vorgegeben sind, empfiehlt es sich daher für jeden Biomolekül-Typ einen entsprechenden orthogonalen Oberflächen-Typ zur Verfügung zu haben. Um die Träger-Oberflächen-Derivatisierung mit dem Linkersystem für alle oben aufgeführten Kombinationen von Endgruppen verfügb

17. November 1998

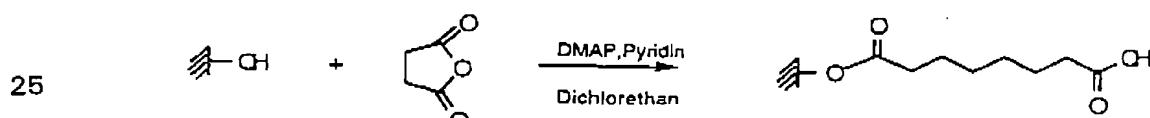
- 13 -

bar zu machen, wurden Methoden zur Um-Derivatisierung der Oberfläche von endständigen Amino-Funktionen (oder auch Hydroxyl) auf endständige Hydroxyl-, Carboxyl- und Phosphat-Gruppen entwickelt (vgl. Beispiele 5, 6, 7).

5 Um-Derivatisierung auf End-Hydroxyl :



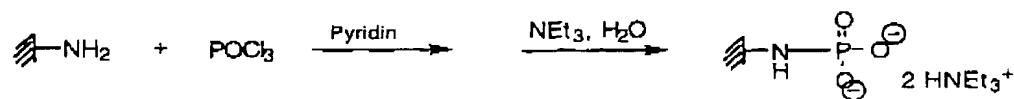
Um-Derivatisierung auf End-Carboxyl :



30 Um-Derivatisierung auf End-Phosphat :

17. November 1998

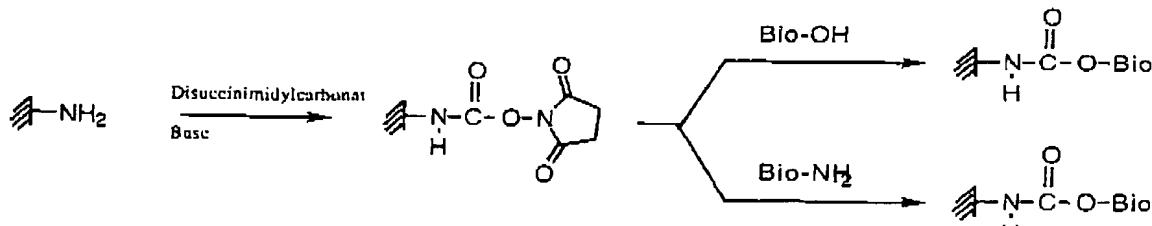
- 14 -



15 (B) Anbindung des Biopolymeren mittels Crosslinker

Unter einer kovalenten Oberflächen-Aktivierung ist eine solche zu verstehen, bei der Crosslinker quasi als End-Gruppe auf das erfindungsgemäß vorher aufgebauten Linker-System (Flexible Linker-System) aufgepropft wurden. Bei diesen handelt es sich vor allem um aktivierte Ester-, Aldehyd-, Imidoester- oder Isothiocyanat-Funktionen, die in der Lage sind, ohne weitere chemische Eingriffe, mit in wässrigen Systemen gelösten Biopolymeren eine kovalente Bindung einzugehen. Als Reagentien der Wahl sind hier v.a. Dissuccinimidylcarbonat, Dissuccinimidyl-oxalat, Glutaraldehyd, Dimethylsüberimidat-Dihydrochlorid oder Phenylendiisothiocyanat zu nennen. Die Umsetzung erfolgt bevorzugt unter basischen Bedingungen, d.h. unter Zusatz von Diisopropylethylamin oder NaCO₃.

20 Prinzip:



30
$$[\text{Bio-OH/Bio-NH}_2 = \text{hydroxy-} / \text{amino-Biomolekül}]$$

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben, welche zeigen:

17. November 1998

- 15 -

Fig. 1: Generierung von Dendrimerstrukturen nach Aktivierung mit Acryloylchlorid

Fig. 2; Generierung von Dendrimerstrukturen nach Aktivierung mit 4-Nitrophenylchloroformiat

5

Die Erfindung wird weiter anhand der Beispiele beschrieben.

10 Beispiel 1: Derivatisierung eines Glasträgers

Ausgegangen wird von aminierten Glasträgern (40 x 48 mm), der entweder kommerziell erhältlich ist oder nach den üblichen Methoden der Silanisierung darstellbar ist. Zur Aktivierung der Aminofunktionen werden die aminierten Glas- 15 träger in 20 ml wasserfreies Dichlorethan mit 200 mg 4-Nitrophenyl-chloroformiat (1 mmol) und 171 µl Diisopropylethylamin (1 mmol) gelegt und für 2 Stunden auf dem Schüttler geschwenkt. Der BPB-Kontrolltest zeigt keine Blaufärbung. Die Glasträger werden über Nacht in 20 ml amin-freiem DMF mit 223 µl Tetraethylenpentamin (1 mmol) umgesetzt. Der BPB-Kontrolltest zeigt eine 20 Blaufärbung. Zum Starten eines neuen Zyklus' werden die Glasträger in 20 ml wasserfreies Dichlorethan mit 200 mg 4-Nitrophenyl-chloroformiat (1 mmol) und 171 µl Diisopropylethylamin (1 mmol) gelegt und für 2 Stunden auf dem Schüttler geschwenkt. Der BPB-Kontrolltest zeigt keine Blaufärbung. Die Glasträger 25 werden über Nacht in 20 ml amin-freiem DMF mit 140 µl 1,4-Bis(3-aminopropyl-oxy)-butan (1 mmol) umgesetzt. Der BPB-Test zeigt eine Blaufärbung.

Die so derivatisierten Glasträger verfügen an ihrer Oberfläche jetzt über Linker an die Biopolymere (z.B. Nukleinsäuren) gekoppelt werden können.

17. November 1998

- 16 -

Beispiel 2: Derivatisierung eines Glasträgers

Ausgegangen wird von einem aminierten Glasträger (40 x 48 mm), der entweder kommerziell erhältlich oder nach den üblichen Methoden über Silanisierung darstellbar ist. Zur Aktivierung der Aminofunktionen werden die aminierten Glästräger in 20 ml wasserfreies Dichlorethan mit 81 µl Acryloylchlorid (1 mmol) und 171 µl Diisopropylethylamin (1 mmol) gelegt und für 2 Stunden auf dem Schüttler geschwenkt. Der BPB-Kontrolltest zeigt keine Blaufärbung. Die Glasträger werden über 2 Nächte in 20 ml amin-freiem DMF mit 223 µl Tetraethylenpentamin (1 mmol) umgesetzt. Der BPB-Kontrolltest zeigt eine Blaufärbung. Zum Starten eines neuen Zyklus' werden die Glasträger in 20 ml wasserfreies Dichlorethan mit 81 µl Acryloylchlorid (1 mmol) und 171 µl Diisopropylethylamin (1 mmol) gelegt und für 2 Stunden auf dem Schüttler geschwenkt. Der BPB-Kontrolltest zeigt keine Blaufärbung. Die Glasträger werden über 2 Nächte in 20 ml amin-freiem DMF mit 140 µl 1,4-Bis(3-aminopropoxy)-butan (1 mmol) umgesetzt. Der BPB-Test zeigt eine Blaufärbung.

Die so derivatisierten Glasträger verfügen an ihrer Oberfläche jetzt über Linker an die Biopolymere (z.B. Nukleinsäuren) gekoppelt werden können.

20

Beispiel 3: Derivatisierung von Polypropylenmembranen

Ausgegangen wird von einer käuflichen hydrophilisierten Polypropylenmembran (8 x 12 cm). Zur Aktivierung wird die Membran mit 324 µl Acryloylchlorid (4 mmol) und 684 µl Diisopropylethylamin (4 mmol) in 30 ml wasserfreiem Dichlorethan auf dem Rüttler zur Reaktion gebracht. Nach 2 Std. wird von der Reaktionslösung abdekantiert und mehrmals sorgfältig mit Dichlorethan gewaschen und getrocknet. Der Bromphenolblau-Test (BPB-Test) zeigt keine Blaufärbung. Nachfolgend wird die aktivierte Membran 2 Tage mit 892 µl Tetraethylenpentamin (4 mmol) in 30 ml aminfreiem DMF auf dem Rüttler geschwenkt. Dann wird die Reaktionslösung abdekantiert und die Membran mehrmals sorgfältig mit

17. November 1998

- 17 -

DMF und dann mit Dichlorethan gewaschen und getrocknet. Der Bromphenolblau-Test zeigt Blaufärbung. Zur weiteren Aktivierung wird die nun aminierte Membran erneut mit 324 μ l Acryloylchlorid (4 mmol) und 684 μ l Diisopropylethylamin (4 mmol) in 30 ml wasserfreiem Dichlorethan auf dem Rüttler zur Reaktion gebracht. Nach 2 Std. wird von der Reaktionslösung dekantiert und mehrmals sorgfältig mit Dichlorethan gewaschen und getrocknet. Der Bromphenolblau-Test (BPB-Test) zeigt keine Blaufärbung. Nachfolgend wird die aktivierte Membran 2 Tage mit 560 μ l 1,6-Bis(3-aminopropoxy)-butan (4 mmol) in 30 mol aminfreiem DMF auf dem Rüttler geschwenkt. Dann wird die Reaktionslösung abdekantiert und die Membran mehrmals sorgfältig mit DMF und dann mit Dichlorethan gewaschen und getrocknet. Der Bromphenolblau-Test (BPB-Test) zeigt Blaufärbung.

15 Beispiel 4: Anbindung von Nukleinsäuren auf Polypropylenmembranen

20 Eine gemäß Beispiel 3 derivatisierte Polypropylenmembran (8 x 12 cm) wird auf einem Whatman-Filterpapier 5 Min. mit einer Lösung aus 54 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimidhydrochlorid und 24 ml N-Methylimidazol in 10 ml Wasser inkubiert. Die Reaktionslösung wird abdekantiert. Die so aktivierte, noch feuchte Polypropylen-Membran kann nun zum kovalenten Aufbringen von Biopolymeren verwendet werden. Nach dem Aufbringen der Biopolymere (z.B. durch Spotting-Roboter oder Nano-Plotter) werden die Proben durch 2 hr Inkubieren bei 65 °C auf der Membran fixiert ; anschliessend wird die Membran 25 sorgfältig mit Wasser gewaschen.

Beispiel 5: Synthese endständiger Hydroxyl-Gruppen

30 a) Aktivierung mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester :
Eine amino-funktionalisierte Polypropylen-Membran (Omnitray-Grösse) gemäß
Beispiel 3 wird in 30 ml wasserfreiem Dichlorethan mit 400 mg Chlorameisen-

17. November 1998

- 18 -

5 säure-4-nitrophenylester (2 mmol) und 342 μ l Diisopropylethylamin (2 mmol) für
10 2 hr auf dem Schüttler geschwenkt. Man wäscht 2 x je 5 min mit 50 ml Dichlor-
methan und trocknet im Stickstoffstrom. Die so aktivierte PP-Membran wird nun
mit 200 ml 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml aminfreiem DMF 30
min auf dem Schüttler geschwenkt, worauf die Reaktionslösung abdekantiert
wird. Nach kurzem Waschem mit DMF wird die PP-Membran erneut mit 200 μ l
2-(2-Aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml aminfreiem DMF versetzt und über
Nacht auf dem Schüttler geschwenkt. Von der Reaktionslösung wird abdekan-
tiert, und die PP-Membran 2x je 5 min mit 50 ml DMF und dann 2 x mit 50 ml
Aceton gewaschen und getrocknet.

b) Aktivierung mit Acryloylchlorid :

15 Eine amino-funktionalisierte Polypropylen-Membran (Omnitray-Grösse) gemäß Beispiel 3 wird in 30 ml wasserfreiem Dichlorethan mit 162 µl Acryloylchlorid (2 mmol) und 342 µl Diisopropylethylamin (2 mmol) für 2 hr auf dem Schüttler geschwenkt. Man wäscht 2 x je 5 min mit 50 ml Dichlormethan und trocknet im 20 Stickstoffstrom. Die so aktivierte PP-Membran wird nun mit 200 µl 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml aminfreiem DMF 30 min auf dem Schüttler geschwenkt, worauf die Reaktionslösung abdekantiert wird. Nach kurzem Waschem mit DMF wird die PP-Membran erneut mit 200 µl 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (2 mmol) in 30 ml aminfreiem DMF versetzt und über Nacht auf dem Schüttler geschwenkt. Von der Reaktionslösung wird abdekantiert, und die PP-Membran 2x je 5 min mit 50 ml DMF und dann 2 x mit 50 ml Aceton gewaschen und getrocknet.

25

Beispiel 6: Synthese endständiger Carboxyl-Gruppen

30 Eine amino-funktionalisierte Polypropylen-Membran (Omnitray-Grösse) gemäß Beispiel 3 wird in 30 ml trockenem Dichlorethan mit 400 mg Bernsteinsäureanhydrid (4 mmol), 1 ml Pyridin (24 mmol) und 488 mg DMAP (4 mmol) über Nacht auf dem Schüttler zur Reaktion gebracht. Nachfolgend wird die Reaktions-

17. November 1998

- 19 -

lösung abdekantiert und die PP-Membran nacheinander mit 30 ml Dichlormethan, 30 ml Aceton, 30 ml 1 % HCl, 2 x 30 ml Wasser und 2 x mit 30 ml Aceton jeweils 5 min. gewaschen und getrocknet.

5

Beispiel 7: Synthese endständiger Phosphat-Gruppen

Unter Eisbadkühlung werden 0.42 ml POCl_3 (4 mmol) in 40 ml trockenem Pyridin gelöst. Nachfolgend werden 828 mg 1,2,4-Triazol (12 mmol) zugefügt. Nach 10 min wird die hydroxyl-funktionalisierte Polypropylen-Membran gemäß Beispiel 4 zugefügt und weitere 10 min unter Eisbadkühlung auf dem Rüttler geschwenkt. Anschliessend wird das Eisbad entfernt und noch 45 min geschwenkt. Die Reaktionslösung wird abdekantiert und vorsichtig mit 50 ml eines Gemisch aus Triethylamin / Dioxan / Wasser hydrolysiert. Man wäscht sorgfältig nacheinander 2 x mit 50 ml Wasser, kurz mit 50 ml 1 % HCl, 2 x mit 50 ml Wasser und 2x 5 min mit 50 ml Aceton und trocknet im Stickstoff-Strom.

15

Beispiel 8: Oberflächen-Aktivierung mit Disuccinimidylcarbonat

20

7 amino-funktionalisierte Glas-Objektträger werden in 30 ml wasserfreiem Acetonitril mit 256 mg Disuccinimidylcarbonat (2 mmol) und 513 μl Diisopropylethylamin (3 mmol) für 4 hr auf dem Schüttler geschwenkt. Man wäscht mit 50 ml Acetonitril, dann mit 50 ml Dichlorethan und trocknet im Stickstoffstrom.

25

17. November 1998

- 20 -

Patentansprüche

- 1) Verfahren zum Derivatisieren von Trägern, wobei eine funktionelle Gruppe auf einer Trägeroberfläche durch Umsetzung mit einem Aktivierungsreagenz aktiviert wird und nachfolgend mit einer Amin-Komponente umgesetzt wird.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Träger ausgewählt sind aus Glas, Folien bzw. Membranen aus Polypropylen, Nylon, Cellulose, Cellulosederivate (z.B. Celluloseacetat, Cellulose-Mischester), Polyethersulfonen, Polyamiden, Polyvinylchlorid, Polyvinylidenfluorid, Polyester, Polyethylen oder Teflon.
- 15 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die funktionelle Gruppe eine Amin-, Hydroxyl-, Phosphat-, Carboxyl-, Carbonyl-, Thiol- oder Amid-Gruppe ist.
- 20 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Aktivierungsreagenz Acryloylchlorid, 4-Nitrophenylchloroformiat, Carbonyldiimidazol, Phenylchloroformiat, Phosgen, Diphosgen, Triphosgen, EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid), N,N'-Diisopropyl-carbodiimid, Dicylohexyl-carbodiimid, Disuccinimidyl-carbonat, Disuccinimidyl-oxalat, Dimethylsüberimidat-Dihydrochlorid oder Phenylendiisothiocyanat ist.
- 25 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, wobei die Amin-Komponente ausgewählt ist aus Monoaminen, Bis-Aminen oder Polyaminen.
- 30 6) Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Mono-Amin 2-Aminoethanol, 6-Amino-1-hexanol, 2-(4-Aminophenyl)-ethanol, 5-Amino-n-valeriansäure, 2-(2-Aminoethoxy)ethanol oder 3-Amino-1,2-propandiol ist.

17. November 1998

- 21 -

7) Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Bis-Amin 1,4-Bis(3-aminopropoxy)butan, O,O'-Bis(2-aminopropyl)polyethylenglykol 500 (= Jeffamin 500), O,O'-Bis(2-aminopropyl)polyethylenglykol 130 (= Jeffamin 130), 4,7,10-Trioxa-1.13-tridecanamin, oder Ethylendiamin ist.

5
8) Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Polyamin Tetraethylenpentamin, Spermin, Spermidin, 4,7,10-Trioxa-1.13-tridecandiamin oder 4-Aminomethyl-1,8-octandiamin ist.

10 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Schritte der Umsetzung mit einem Aktivierungsreagenz und einer Amin-Komponente mehrmals durchgeführt werden.

15
10) Verfahren nach Anspruch 9, wobei es zum Aufbau von Dendrimer-Strukturen an der Trägeroberfläche kommt.

11) Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es zum gesteuerten Aufbau von positiver Ladung an der Trägeroberfläche kommt.

20
12) Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, wobei zusätzlich die gemäß einem Ansprache 1-11 derivatisierte Trägeroberfläche vor dem Anbinden von Biopolymeren aktiviert wird.

25
13) Verfahren nach Anspruch 12, wobei als Aktivierungsmittel Disuccinimidylcarbonat, Disuccinimidylloxalat, Glutaraldehyd, Dimethyl-Dihydrochlorid oder Phenylendiisothiocyanat verwendet wird.

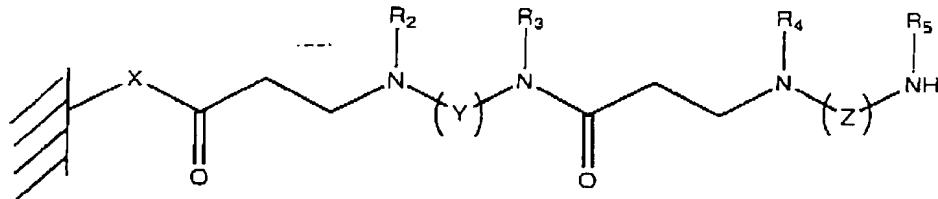
14) Träger geeignet zur Anbindung von Biopolymeren, wobei der Träger an seiner Oberfläche Linker mit folgender Struktur aufweist:

30

17. November 1998

- 22 -

5



10

X = O, NHR₁

Y, Z = können gleich oder verschieden sein und ausgewählt sein aus

-(CH₂)_n --(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-(CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂- usw.

15

R₁-R₅ = können gleich oder verschieden sein und ausgewählt sein aus gerader oder verzweigter Alkylrest mit 1-30 Kohlenstoffatomen, gerader oder verzweigter Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, mono- oder polzyklischer Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen oder mono- oder polzyklischer Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen oder mono- oder polzyklischen Rest mit 6 bis 30 Kohlenstoffatomen, wobei die Reste ggf. durch einen oder mehrere Substituenten (z.B. OH, Carboxyl, Carbonyl, Phosphat-) substituiert sein können)

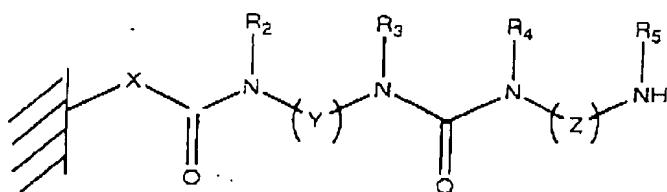
20

25

n = 1-50

30

oder



17. November 1998

- 23 -

X = O, NHR₁
Y, Z = können gleich oder verschieden sein und ausgewählt sein aus
-(CH₂)_n-
-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂
-(CH₂CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂CH₂- usw.

5 R₁-R₅ = können gleich oder verschieden sein und können ausgewählt sein aus gerader oder verzweigter Alkylrest mit 1-30 Kohlenstoffatomen, gerader oder verzweigter Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, mono- oder polzyklischer Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen oder mono- oder polzyklischer Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen oder mono- oder polzyklischen Rest mit 6 bis 30 Kohlenstoffatomen, wobei die Reste ggf. durch einen oder mehrere Substituenten (z.B. OH, Carboxyl, Carbonyl, Phosphat-) substituiert sein können)

10 n = 1-50

15

20 15) Träger geeignet zur Anbindung von Biopolymeren, wobei dieser an seiner Oberfläche Linker in Form von Dendrimer-Strukturen aufweist.

16) Verwendung eines nach einem der Ansprüche 1-11 hergestellten Trägers oder eines Trägers nach Anspruch 14 oder 15 zur Anbindung von Biopolymeren.

25

17) Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Biopolymere aus DNA, RNA, Nukleotidanaloga, Peptiden, Proteinen oder Antikörpern ausgewählt sind.

30

17. November 1998

- 24 -

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Derivatisieren von Trägern,
5 wobei eine funktionelle Gruppe auf einer Trägeroberfläche durch Umsetzung mit
einem Aktivierungsreagenz aktiviert wird und nachfolgend mit einer Amin-Kom-
ponente umgesetzt wird. Weiter betrifft die Erfindung einen Träger mit Den-
drimerstruktur an seiner Oberfläche sowie die Verwendung eines erfindungs-
gemäß hergestellten Trägers zur Anbindung von Biopolymeren.

1/2

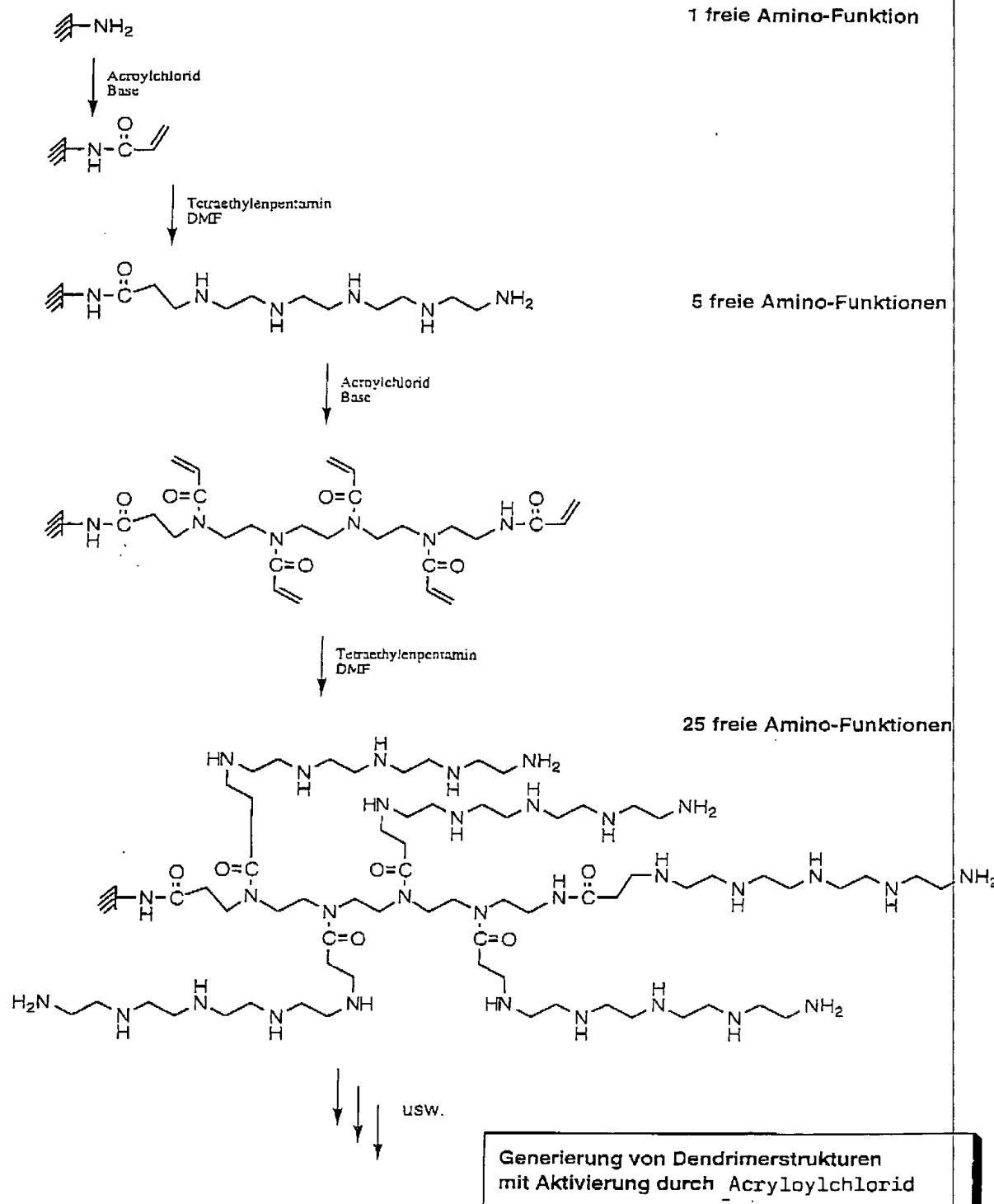
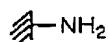


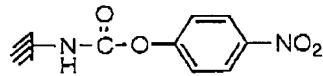
Fig. 1

2/2

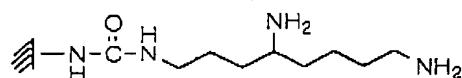
1 freie Amino-Funktion



↓
4-Nitrophenyl-chloroformiat
Ethyldiisopropylamin, Dichlormethan

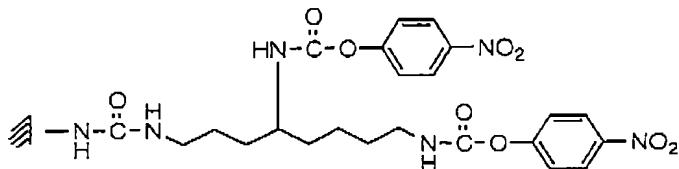


↓
1,7,10-Trioxa-1,13-tridecaniamin
DMF

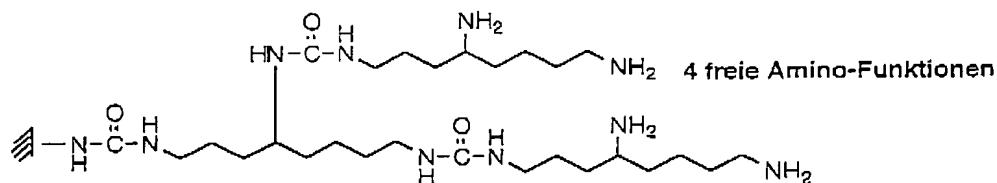


2 freie Amino-Funktionen

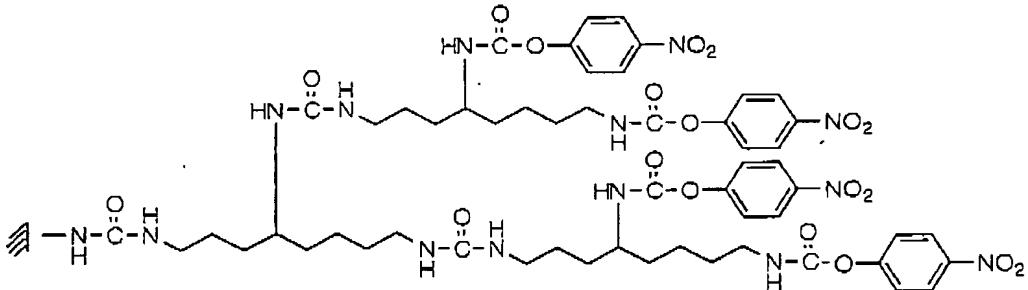
↓
4-Nitrophenyl-chloroformiat
Ethyldiisopropylamin, Dichlormethan



↓
1,7,10-Trioxa-1,13-tridecaniamin
DMF



↓
4-Nitrophenyl-chloroformiat
Ethyldiisopropylamin, Dichlormethan



↓
↓
USW.

Generierung von Dendrimerstrukturen mit
Aktivierung durch 4-Nitrophenyl-chloroformiat

Fig. 2